



**Bases de la resistencia a  
preparados bioinsecticidas basados en  
*Bacillus thuringiensis*  
en diferentes especies de insectos**

Departament de Genètica  
[Programa de doctorado: Genètica Molecular y Evolutiva]

TESIS DOCTORAL  
María de Sales Ibiza Palacios  
2015

Dirigida por:  
Dr. Baltasar Escriche Soler



TESIS DOCTORAL

**Bases de la resistencia a  
preparados bioinsecticidas basados en  
*Bacillus thuringiensis*  
en diferentes especies de insectos**

**María de Sales Ibiza Palacios  
2015**

**Departament de Genètica**

[Programa de doctorado 194A: Genética Molecular y Evolutiva]



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

**Director:**

**Dr. Baltasar Escriche Soler**

Profesor Titular de la Universidad

Departamento de Genética

ERI de Biotecnología y Biomedicina

Universitat de València

Fdo. M<sup>a</sup> de Sales Ibiza Palacios



Dr. D. BALTASAR ESCRICHE SOLER, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

INFORMA:

Que Dña. MARÍA DE SALES IBIZA PALACIOS, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria que lleva por título: “Bases de la resistencia a preparados bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* en diferentes especies de insectos”.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firma la presente en Burjassot, a 23 de marzo de 2015.

Fdo.: Dr. D. Baltasar Escriche Soler



## AGRADECIMIENTOS

Son muchos los años que han transcurrido desde que dejé el laboratorio para incorporarme a la empresa privada hasta ahora. Uff!! Son tantas las experiencias acumuladas, los sentimientos vividos, las bajadas, las subidas..., todo un cúmulo de vivencias que por fin han dado su fruto, por fin.

Son tantas las personas a las que tengo que agradecer su apoyo durante todos estos años, que no sé ni por donde empezar. Seré breve. En primer lugar dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio Yolanda, Sara, Salva, Patri, Joel, Ana's y tantos otros que pasaron por el laboratorio y que de alguna u otra forma dejaron mella en este mi recorrido. Balta, mi jefe de tesis, gracias por tu tiempo, por tu dedicación hacia mi formación en este mundo de la investigación y sobre todo por apostar por mí desde el principio, gracias de todo corazón. Juan, aunque en mi caso estuviste un poco en la sombra, gracias a ti, yo creo que todos no solo yo, te agradecemos esa forma de ser que tienes, todo un ejemplo a seguir donde trabajo, ilusión y alegría van siempre unidas de la mano.


A mis padres, por su trabajo, sacrificios y apoyo para poder llegar hasta aquí y ser lo que soy, gracias; por vuestros consejos y reflexiones; y por el mejor legado que podéis haberme dejado, la educación.

Gracias a todos mis amigos y amigas, por cada una de las palabras de aliento, de confianza, de fuerza que me habéis transmitido una y otra vez. Sin vosotros, nada de esto hubiera sido posible ¡Un millón de gracias! de verdad.

Por último, gracias a la ilusión y apoyo incondicional que personas con gran corazón me demuestran día a día. Personas que sin ellas este mundo no sería posible y que con ellas se vive muchísimo mejor.



*“Ser libre no es solo sacudirse las propias cadenas, sino vivir de un modo que respete y amplie la libertad de los demás” – Nelson Mandela*

*A mi familia, al completo...* 





# ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1. LA BACTERIA ENTOMOPATÓGENA <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	3
1.1 Historia de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	3
1.2 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	5
1.2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> sp. ....	5
1.2.1.1 Clasificación interespecífica de <i>B. thuringiensis</i> .....	6
1.2.1.2 Clasificación intraespecífica de <i>B. thuringiensis</i> .....	7
1.2.2 Ecología de <i>B. thuringiensis</i> .....	8
1.2.3 Ciclo biológico de <i>B. thuringiensis</i> .....	9
1.3 Factores de virulencia producidos por <i>B. thuringiensis</i> durante la fase vegetativa .....	10
1.3.1 Las $\beta$ -exotoxinas .....	10
1.3.2 Proteínas insecticidas vegetativas .....	11
1.3.3 Otros factores tóxicos .....	13
1.4 Factores de virulencia producidos por <i>B. thuringiensis</i> durante la fase de esporulación .....	14
1.4.1 Las $\delta$ -endotoxinas .....	14
1.4.2 Las proteínas Cyt .....	16
1.5 Clasificación de las $\delta$ -endotoxinas .....	19
1.6 Estructura de las $\delta$ -endotoxinas .....	22

1.7 Modo de acción de las toxinas Cry.....	28
1.7.1 Ingestión del cristal .....	29
1.7.2 Solubilización de los cristales Bt.....	29
1.7.3 Activación .....	30
1.7.4 Paso a través de la membrana peritrófica .....	31
1.7.5 Unión a la membrana .....	31
1.7.5.1 Unión reversible e irreversible de las toxinas Cry .....	32
1.7.5.2 Moléculas de anclaje de la toxina a membrana .....	35
1.7.5.2.1 Aminopeptidasas N .....	35
1.7.5.2.2 Caderinas.....	40
1.7.5.2.3 Otros receptores .....	45
1.7.5.2.4 Composición de la membrana lipídica .....	46
1.7.6 Muerte celular .....	46
1.7.6.1 Modelo de formación de poro .....	46
1.7.6.2 Modelo de transducción de la señal .....	50
1.7.6.3 Modelo de síntesis .....	52
1.7.6.4 Complejo proteico transportador ABC.....	53
2. PRODUCTOS COMERCIALES Y PLANTAS TRANSGÉNICAS Bt.....	57
2.1 Productos Bt.....	57
2.2 Plantas transgénicas Bt .....	59
3. RESISTENCIA A <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	62
3.1 Mecanismos de resistencia .....	63
3.1.1 Alteración del procesado proteolítico .....	64
3.1.2 Alteración de la unión a membrana .....	65
3.2 Genética de la resistencia .....	67
3.2.1 Variabilidad genética .....	68
3.2.2 Frecuencia inicial de los alelos de resistencia.....	68
3.2.3 Herencia de la resistencia.....	70

3.3 Resistencia cruzada .....	72
3.4 Estrategias de prevención de la aparición de la resistencia.....	74
3.4.1 Estrategia del refugio.....	75
3.4.2 Expresión de varias toxinas en la misma planta .....	77
3.4.3 Otros métodos de control .....	78
3.5 Estabilidad de la resistencia .....	79
4. INSECTOS DE ESTUDIO .....	79
4.1 <i>Plutella xylostella</i> L. (Lepidoptera: Plutellidae) .....	79
4.1.1 Biología .....	80
4.1.2 Daños y resistencia .....	82
4.2 <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera: Bombycidae) .....	85
4.2.1 Modelo de estudio.....	85
4.2.2 <i>B. mori</i> y Bt .....	87
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>89</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>91</b>
1. INSECTOS EMPLEADOS.....	91
1.1 Cepas de <i>Plutella xylostella</i> y mantenimiento en condiciones de laboratorio .....	91
1.2 Cepas de <i>B. mori</i> .....	97
2. PROTEÍNAS Cry EMPLEADAS .....	101
2.1 Preparación de proteínas Cry a partir de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	101
2.2 Preparación de la toxina Cry1Ab y Cry1Ca a partir de <i>E. coli</i> .....	103
3. BIOENSAYOS DE SELECCIÓN Y TOXICIDAD .....	105
4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RESISTENCIA EN CEPAS DE <i>P. xylostella</i> A TOXINAS Cry DE <i>B. thuringiensis</i> .....	106
4.1 Realización de cruces en masa.....	106
4.2 Ensayos de toxicidad .....	107
4.3 Dominancia .....	107
4.4 Tratamiento informático de los resultados.....	107

5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS AMINOPEPTIDASAS, CADERINA Y OTROS MARCADORES MOLECULARES.....	108
5.1 Diseño de los cebadores .....	108
5.1.1 Aminopeptidasas N.....	108
5.1.1.1 Aminopeptidasas N en <i>P. xylostella</i> .....	108
5.1.1.2 Aminopeptidasas N en otras especies de lepidópteros .....	111
5.1.2 Caderina.....	111
5.1.3 Marcador molecular STS.....	112
5.2 Extracción ADN genómico.....	113
5.3 Reacción en cadena de la polimerasa .....	114
5.3.1 Amplificación de las aminopeptidasas .....	114
5.3.2 Amplificación de la caderina y digestión mediante enzimas de restricción.....	114
5.3.3 Amplificación del marcador molecular STS .....	115
5.4 Electroforesis de agarosa y purificación de bandas .....	115
5.5 Análisis de las secuencias.....	116
5.6 Estudios de ligamiento entre marcadores moleculares.....	118
5.6.1 Elaboración de familias.....	118
5.6.2 Tratamiento informático de los resultados .....	118
5.7 Estudio de complementación genética de la resistencia entre las cepas Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang de <i>P. xylostella</i> .....	119
6. ENSAYOS DE UNIÓN DE LAS TOXINAS Cry CON BBMV.....	120
6.1 Purificación de las toxinas Cry.....	120
6.2 Marcaje radiactivo de las toxinas Cry .....	121
6.3 Determinación de la actividad específica de las toxinas Cry marcadas .....	123
6.4 Preparación de BBMV y su caracterización enzimática .....	126
6.4.1 Fosfatasa alcalina (FAL).....	127
6.4.2 $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT).....	128
6.4.3 Leucin aminopeptidasa (LAP) .....	128

6.5 Cinética de unión .....	130
6.6 Ensayos de unión .....	130
6.7 Ensayos de competencias y cálculo de los valores $K_d$ y $R_t$ .....	132
6.8 Determinación de la unión reversible-irreversible de las toxinas Cry.....	133
6.9 Ensayos de bloqueo de la unión con anticuerpos.....	134
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>137</b>
<b>BLOQUE I. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LIGAMIENTO DE GENES CODIFICANTES PARA LOS RECEPTORES DE LAS TOXINAS Cry .....</b>	<b>137</b>
1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS AMINOPEPTIDASAS .....	137
1.1 Caracterización parcial de la estructura genómica de diferentes aminopeptidasas de <i>P. xylostella</i> .....	137
1.2 Estructura genómica de las aminopeptidasas en otras especies de insectos: <i>Helicoverpa armigera</i> y <i>B. mori</i> .....	143
1.3 Análisis filogenético .....	147
1.4. Aparición de una región conservada entre diferentes aminopeptidasas .....	150
2. BÚSQUEDA DE MARCADORES GENÉTICOS Y ESTUDIOS DE LIGAMIENTO CON <i>Plutella xylostella</i> .....	157
2.1 Marcadores genéticos.....	157
2.1.1 Aminopeptidasas como marcadores genéticos.....	157
2.1.1.1 Aminopeptidasas en la colonia susceptible LAB-PS .....	157
2.1.1.2 Aminopeptidasas en la cepa resistente SEL-B.....	160
2.1.2 Caderina como marcador genético en LAB-PS y SEL-B.....	162
2.1.3 Marcador molecular STS.....	164
2.2 Estudios de ligamiento .....	166
2.2.1 Estudios de ligamiento entre las aminopeptidasas .....	166
2.2.2 Estudio de ligamiento entre el marcador molecular STS y las aminopeptidasas .....	166
<b>BLOQUE II. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN <i>Plutella xylostella</i> .....</b>	<b>167</b>
1. EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA DE LA CEPA SEL-B .....	167
1.1 Selección y caracterización toxicológica de la cepa SEL-B .....	167

1.2 Cálculo de la CL <sub>50</sub> para Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa .....	170
2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RESISTENCIA EN <i>P. xylostella</i> .....	173
2.1 Estudio de la herencia de la resistencia en la cepa SEL-B .....	173
2.2 Ensayos de complementación genética entre las cepas resistentes Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang .....	176
3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA EN LAS CEPAS SEL-B, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang .....	178
3.1 Ensayos de unión de la cepa SEL-B con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac.....	178
3.2 Ensayos de unión de la población Karak con las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ca.....	179
3.3 Ensayos de unión de la cepa Cry1Ab-SEL con las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ca.....	180
3.4 Ensayos de unión de la cepa Kluang con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac .....	182
3.5 Perfiles enzimáticos .....	183
3.5.1 Comparación del perfil enzimático entre cepas resistentes y susceptibles de <i>P. xylostella</i> .....	183
3.5.2 Caracterización del perfil enzimático de las enzimas fosfatasa alcalina (FAL) y $\gamma$ -glutamil transferasa (GGT) tras los ensayos de complementación.....	187
<b>BLOQUE III. ESTUDIO DEL MECANISMO DE TOLERANCIA A TOXINAS Bt EN DIFERENTES CEPAS DEL LEPIDÓPTERO INSECTO MODELO <i>Bombyx mori</i></b> .....	190
1. BIOQUÍMICA DE LA UNIÓN DE LAS TOXINAS Cry EN <i>B. mori</i> .....	190
1.1 Perfil de unión a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en tres cepas de <i>B. mori</i> .....	190
1.2.1 Cinética de unión con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac .....	190
1.2.2 Ensayos de unión con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac .....	191
1.2.3 Ensayos de competencias con Cry1Ab y Cry1Ac.....	192
1.2.4 Actividad enzimática leucin aminopeptidasa (LAP) en BBMV .....	196
1.2 Caracterización de la unión reversible e irreversible de la toxina Cry1Ab a BBMV de <i>B. mori</i> .....	197
1.2.1 Cinética de unión de Cry1Ab en la cepa J65 de <i>B. mori</i> .....	197
1.2.2 Ensayos de disociación con las cepas J65, Kin y C7. Determinación de la unión reversible e irreversible.....	198

2. MODELO DE RECEPTORES EN <i>Bombyx mori</i> .....	201
2.1 Las APN y las caderinas como candidatos a receptores de Cry1Ab .....	201
2.2 Modelo de unión de la toxina Cry1Ab en <i>B. mori</i> .....	203
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>205</b>
<b>BLOQUE I. CARACTERIZACIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA LOS RECEPTORES DE LAS TOXINAS Cry. ESTUDIO DE LIGAMIENTO</b> .....	<b>205</b>
1. Estructura genómica y caracterización de genes codificantes para aminopeptidasas .....	205
2. Análisis filogenético .....	207
3. Motivo conservado .....	209
4. Análisis de ligamiento de las aminopeptidasas de <i>P. xylostella</i> .....	211
<b>BLOQUE II. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN <i>Plutella xylostella</i></b> .....	<b>214</b>
1. Caracterización genética de la resistencia .....	214
2. Complementación genética de los genes de resistencia .....	218
3. Caracterización bioquímica de la resistencia .....	221
4. Perfiles enzimáticos .....	226
<b>BLOQUE III ESTUDIO DEL MECANISMO DE TOLERANCIA A TOXINAS Bt EN DIFERENTES CEPAS DEL LEPIDÓPTERO INSECTO MODELO <i>Bombyx mori</i></b> .....	<b>230</b>
1. Caracterización de la unión reversible e irreversible de la toxina Cry1Ab a BBMV de <i>B. mori</i> .....	230
2. Moléculas implicadas en la unión de Cry1Ab en la cepa J65 de <i>B. mori</i> .....	236
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>241</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>245</b>



## Abreviaturas

**ABC:** del inglés *ATP-binding cassette transporter*

**ABCC2:** del inglés *ABC transporter subfamily C2*

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**ALP:** fosfatasa alcalina; del inglés *alkaline phosphatase*

**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico; del inglés *cyclic adenosine monophosphate*

**APN:** aminopeptidasa N

**ARN:** ácido ribonucleico

**ATP:** adenosín trifosfato; del inglés *adenosine triphosphate*

**BBMV:** vesículas preparadas a partir de células del ribete en cepillo; del inglés *brush border membrane vesicle*

**BmAPN:** aminopeptidasa de *Bombyx mori*

**BSA:** albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*

**Bt:** *Bacillus thuringiensis*

**CIP:** control integrado de plagas

**CL<sub>50</sub>:** concentración letal que elimina al 50% de los individuos

**cpm:** cuentas por minuto

**Cry:** proteínas cristalinas; del inglés *crystal proteins*

**D<sub>CL</sub>:** dominancia mediante la estimación de los valores de CL<sub>50</sub>

**EPA:** Agencia de Protección del Medio Ambiente de EEUU

**EpAPN:** aminopeptidasa de *Epiphyas postvittana*

**EST:** del inglés *expressed sequence tags*

**F<sub>x</sub>:** generación filial

**FAL:** fosfatasa alcalina

**FPLC:** técnica cromatográfica líquida rápida de separación de proteínas; del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*

**GalNAc:** N-acetilgalactosamina

**GGT:**  $\gamma$ -glutamil transferasa

**GPI:** glicosilfosfatidilinositol

**GST:** glutatión S-transferasa

**h:** horas

**HaAPN:** aminopeptidasa de *Helicoverpa armigera*

**HpAPN:** aminopeptidasa de *Helicoverpa punctigera*

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia; del inglés *high-performance liquid chromatography*

**HvAPN:** aminopeptidasa de *Helicoverpa armigera*

**ICP:** del inglés *Insecticidal Crystal Proteins*

**K<sub>d</sub>:** constante de disociación

**LC<sub>95</sub>:** límites de confianza al 95%

**LdAPN:** aminopeptidasa de *Lymantria dispar*

**LF<sub>95</sub>:** límites fiduciales al 95%

**LG:** grupo de ligamiento

**min:** minutos

**MPI:** manosa fosfato isomerasa; del inglés *mannose phosphate isomerase*

**MsAPN:** aminopeptidasa de *Manduca sexta*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**P:** generación parental

**pb:** pares de bases

**PBS1x:** tampón fostato salino KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM pH 7.4; del inglés *phosphate buffered saline*

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa; del inglés *polymerase chain reaction*

**PxAPN:** aminopeptidasa de *Plutella xylostella*

**rpm:** revoluciones por minuto

**RR:** resistencia relativa

**R<sub>t</sub>:** concentración de sitios de unión

**s:** segundos

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico; del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

**SE:** error estándar

**SEM:** error estándar de la media

**SNP:** del inglés *single nucleotide polymorphism*

**SPR:** del inglés *surface plasmon resonance*

**STS:** marcador molecular; del inglés *sequence-tagged site*

**U:** unidades enzimáticas

# I. INTRODUCCIÓN

La agricultura ecológica es, hoy por hoy, una alternativa al alza de la agricultura tradicional, que nos permite disfrutar de una serie de productos libres de restos de insecticidas químicos, y que de alguna forma pueden ser una vía para mantener la economía para los agricultores.

Los insecticidas químicos (también llamados de origen sintético) pueden perjudicar a largo plazo la salud de los consumidores, además de ser, en su gran mayoría nocivos para el medio ambiente, por su amplio espectro de acción. Los avances científicos y su repercusión mediática, han concienciado y despertado, cada vez más, el interés de la sociedad por saber aquello que le perjudica, de forma que se vuelve sumamente exigente por saber el origen de aquello que come, los tratamientos y manipulación que reciben, y un sinnúmero de cuestiones que preocupan cada vez más al consumidor. Así pues, ante la presión de la sociedad y ante el hecho de que nuestro medioambiente está cada vez más degradado, el desarrollo y fomento de insecticidas ecológicos está cada vez más apoyado sobretodo mediante subvenciones económicas y planes de investigación en toda Europa.

Todo el sistema de control biológico de plagas, se contempla en el plan de acción llamado, en un primer momento, control integrado, pasando después a denominarse control integrado de plagas (CIP) o en inglés *Integrated Pest Management* (IPM). Éste sistema se basa en correlacionar el uso de plaguicidas con los ciclos biológicos de las plagas, priorizando la economía del usuario y la sostenibilidad del plaguicida con el medio ambiente y el ser humano. Numerosos han sido los organismos entomopatógenos descritos

dentro de los grupos taxonómicos de los hongos, bacterias, nematodos y virus, sin embargo, el más destacado ha sido si lugar a dudas, la bacteria *Bacillus thuringiensis*. De hecho, tras el primer formulado comercial en 1938, el Sporeine, fabricado en Francia y activo contra lepidópteros, impulsó el desarrollo de nuevos formulados basados en *B. thuringiensis* (productos Bt). Sin embargo, debido a que sólo se emplearan unas pocas cepas en los formulados de *B. thuringiensis*, al uso creciente de este tipo de productos y a la gran plasticidad genética de los insectos, acabó en la aparición del primer caso de resistencia en campo del lepidóptero plaga *Plutella xylostella* (Tabashnik, 1991).

Bajo condiciones de laboratorio otros insectos plaga, susceptibles a los productos Bt, también han desarrollado resistencia (Ferre y Van Rie, 2002). Así pues, frente a esta problemática, muchos han sido, y siguen siendo, como se presenta en esta tesis doctoral, los esfuerzos y estudios científicos dedicados a la comprensión y control de tal resistencia. Siempre con el interés de continuar con su uso por considerarlos ideales para el control integrado de plagas, dada su sostenibilidad con el medio ambiente y su actividad específica frente a determinados insectos diana.

## 1. LA BACTERIA ENTOMOPATÓGENA *Bacillus thuringiensis*

### 1.1 Historia de la bacteria *Bacillus thuringiensis*

Fue a partir del siglo XIX, con el desarrollo de la Microbiología, cuando el descubrimiento de microorganismos entomopatógenos fue incrementándose, tras el conocimiento de que su uso podría resultar beneficioso en el campo. De todos los descritos hasta el momento, sólo los productos insecticidas basados en la bacteria *B. thuringiensis* son los más utilizados.

Los primeros datos que se registran son del año 1901, cuando el biólogo japonés Ishiwata aisló la bacteria *B. thuringiensis* como el agente causante de la muerte de millones de larvas del gusano de seda (*Bombyx mori*) en las granjas productoras de seda (Ishiwata, 1901). La denominación de *Bacillus thuringiensis*, tal y como hoy se la conoce, fue asignada por el científico alemán Berliner, puesto que reaisló esta misma bacteria en larvas infestadas de la polilla gris de la harina (*Ephestia kuehniella*) en la región alemana de Thüringen (Berliner, 1915). El efecto de esta bacteria radicaba en una merma en la emergencia de adultos tras la pupa y a una prolongación del período generacional, además de presentarse problemas de fecundidad (Afify y Matter, 1969).

Ante la evidencia de que esta bacteria representaba más bien una arma eficaz para el control de plagas que un enemigo contra las poblaciones de insectos, se llevó a cabo en 1929 en Hungría, la primera aplicación en campo contra el lepidóptero *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo). Posteriormente, en 1938 se comercializó en Francia el primer producto comercial llamado Sporeine<sup>®</sup>. Luego se comercializó en EEUU como Thuricide en 1957. Sin embargo, tras el descubrimiento al cabo de pocos años de los plaguicidas químicos, el empleo de los insecticidas basados en *B. thuringiensis* sufrió un serio declive puesto que éstos presentaban un estrecho espectro de acción (su acción se restringía al orden de los lepidópteros) frente al amplio espectro que

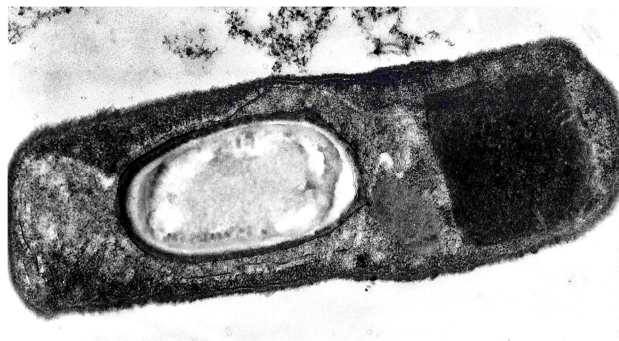
presentaban los plaguicidas químicos, además de su mejor persistencia en campo. Pero en la década de los sesenta se empezó a observar un claro deterioro del medio ambiente debido al uso excesivo de los pesticidas químicos, lo que despertó una gran preocupación que conllevó a que la sociedad se concienciara sobre la degradación a la que el medioambiente empezaba a verse sometido. Este hecho junto con el descubrimiento de nuevas cepas de *B. thuringiensis* más efectivas y contra otros órdenes de insectos (Coleoptera y Diptera), fomentó por la opción de usar de nuevo los formulados bioinsecticidas. Por ejemplo, en 1970 Dulmage descubrió la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* a partir de larvas enfermas de lepidópteros en EEUU. Esta serovariedad resultó ser entre 2 y 200 veces más tóxica que las variedades anteriormente utilizadas en la producción comercial de bioinsecticidas. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de EEUU (EPA) la designó como estándar de potencia o unidad internacional de toxicidad (van Frankenhuyzen, 1993). En 1977 dos entomólogos israelíes aislaron un bacilo a partir de larvas del mosquito *Culex* sp. Este bacilo se designó con el nombre de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*, y fue considerado útil en salud pública para el control de enfermedades tropicales por ser patógeno de larvas del mosquito *Aedes aegypti*, vector del dengue (Goldberg y Margalit, 1977). En los años 80 fueron descritas otras cepas *B. thuringiensis* serovar. *tenebrionis* y "San Diego", activos contra coleópteros (Krieg *et al.*, 1983).

A partir de entonces, no se han dejado de buscar nuevas cepas y de conseguir nuevos formulados para su comercialización en el mercado. Actualmente, los diferentes formulados comerciales basados en esta bacteria, representan el 90% de los productos bioinsecticidas comercializados.

## 1.2 Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

### 1.2.1 *Bacillus thuringiensis* sp.

*B. thuringiensis* es una bacteria Gram positiva que pertenece a la familia Bacillaceae y que en el proceso de esporulación forma uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica, birefringentes mediante microscopio óptico de contraste de fases (**Fig. 1**). Los cristales son agregados de proteínas llamadas toxinas Cry (de *Crystal proteins*), ICPs (de *Insecticidal Crystal Proteins*) o  $\delta$ -endotoxinas. Los cristales pueden tener distintas formas (bipiramidales, cúbicos, romboidales, esféricos, rectangulares, triangulares e irregulares) dependiendo de las proteínas que lo integran. Presentan unos tamaños que oscilan desde los 350 nm de diámetro en algunos cristales irregulares a las 2  $\mu\text{m}$  de longitud en muchos bipiramidales. Teniendo en cuenta que *B. thuringiensis* mide aproximadamente entre 1.0-1.2  $\mu\text{m}$  de ancho y 3-5  $\mu\text{m}$  de largo, el cristal representa una parte destacada. Se sabe que representa un 25% del peso en seco de la bacteria esporulada, lo que representa unos 0.5 mg de proteína por ml de cultivo en condiciones de laboratorio (Agaisse y Lereclus, 1995).



**FIGURA 1. Micrografía electrónica de *B. thuringiensis* durante el proceso de esporulación.** El cristal paraesporal se corresponde con la inclusión oscura que se observa. Fte.: Agaisse y Lereclus, (1995).



Se ha observado que las toxinas Cry que integran el cristal son las que producen el efecto insecticida. Esta actividad ha sido reconocida para unas determinadas especies de insectos, pero pertenecientes a un amplio rango de órdenes: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallophaga (Schnepf *et al.*, 1998). Además, también presentan actividad biocida contra otros invertebrados como nematodos, ácaros y protozoos (Feitelson *et al.*, 1992).

### 1.2.1.1 Clasificación interespecífica de *B. thuringiensis*

De estudios filogenéticos se desprende que *B. thuringiensis* pertenece al llamado “grupo de *Bacillus cereus*”, formado por *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Dentro de este grupo *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis* guardan una estrecha relación. Se considera que es la síntesis del cristal paraesporal lo que diferencia, *a priori*, *B. thuringiensis* de las otras dos, pero aún así, no es del todo cierto, ya que existen cepas de *B. thuringiensis* que no sintetizan el cristal. Además, algunas cepas de *B. cereus* son capaces de hibridar con sondas específicas para genes *cry1A* de *B. thuringiensis* (Schnepf *et al.*, 1998). La gran similitud a nivel genético que guardan estas tres especies, llevó a que muchos autores las consideraran como una única especie (Helgason *et al.*, 2000). Sin embargo, debido a que cada una difiere en la especificidad del hospedador y en la patogeneidad, se volvieron a considerar como especies diferentes puesto que *B. cereus* es un contaminante común del arroz y de productos lácteos, su ingestión provoca vómitos y diarreas (Granum y Lund, 1997), y *B. anthracis* provoca la letal enfermedad del ántrax (Mock y Fouet, 2001).

Mediante diferentes técnicas moleculares se consiguieron diferenciar entre sí a este grupo de especies, a pesar de la alta homología de sus secuencias genéticas. Algunas de las técnicas empleadas fueron, la hibridación DNA-DNA

(Read *et al.*, 2003), métodos alternativos como el uso de *microarrays* (Dorrell *et al.*, 2005), la determinación de la huella genética (Andersen *et al.*, 1996), el uso de marcadores moleculares (Keim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008) o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Oliwa-Stasiak *et al.*, 2010). También se han aprovechado las regiones variables de los genes 16S del ARNr para diferenciar este grupo bacteriano aunque no siempre con éxito (Ash *et al.*, 1991). Sin embargo, ha sido la comparación de la región espaciadora de los ARN ribosomales 16S y 23S (Bourque *et al.*, 1995; Daffonchio *et al.*, 2006) la que más se ha utilizado para su clasificación filogenética. Los resultados de todos estos trabajos han revelado una clara divergencia entre *B. anthracis* y el resto (Kolsto *et al.*, 2009), pero aún existe una gran similitud entre *B. cereus* y *thuringiensis*. Actualmente, otros trabajos están haciendo uso de la espectroscopia de masas basada en técnicas de proteómica para clasificar estas especies de bacterias (Dworzanski *et al.*, 2010).

#### **1.2.1.2 Clasificación intraespecífica de *B. thuringiensis***

La clasificación de las subespecies de *B. thuringiensis* basada en la identificación serológica del antígeno flagelar o antígeno H, por su reproducibilidad, especificidad y fiabilidad, se introdujo a principios de los años 60 (de Banjac y Bonnefoi, 1962). Esta metodología permite separar las nuevas cepas aisladas en diferentes serotipos, en base a los factores antigénicos determinados por el flagelo bacteriano. De esta forma se han clasificado 82 serovares en base a 69 serotipos diferentes. Un serovar agrupa aquellos aislados con idéntica composición antigénica en la proteína flagelar, mientras que un serotipo agrupa aquellos aislados que comparten al menos un factor antigénico, lo que implica que un mismo aislado puede pertenecer simultáneamente a más de un serotipo. Aunque este método de clasificación resultó sencillo y eficiente, también tiene limitaciones ya que la caracterización del antígeno flagelar no es posible en los casos de aislados que no forman

flagelos. Además, existen cepas de *B. cereus* que presentan reacción cruzada al antígeno H de *B. thuringiensis* (Lecadet *et al.*, 1999).

Otras técnicas para poder clasificar intraespecíficamente a *B. thuringiensis* se han empleado como: PCR (Carozzi *et al.*, 1991, Vidal-Quist *et al.*, 2009), la estimación del número y tamaño de los plásmidos (Reyes-Ramirez y Ibarra, 2008), detección de polimorfismos (RFLP) (Kuo y Chak, 1996), microseries de ADN (Letowski *et al.*, 2005) y obtención del perfil proteico mediante la separación de las proteínas Cry en geles de acrilamida (Escriche *et al.*, 2001). De todas formas, los perfiles proteicos sólo dan una información parcial, ya que sólo podemos diferenciar entre algunos grupos de proteínas Cry por su peso molecular.

La toxicidad es otro parámetro medible para poder diferenciar las subespecies de *B. thuringiensis* mediante la realización de bioensayos estableciendo el espectro toxicológico (Ibarra *et al.*, 2003); o mediante la identificación del perfil proteico a través de la separación de las diferentes proteínas del cristal mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (*high performance liquid chromatography*) (Masson *et al.*, 1998), y más recientemente por inmuno-PCR (Allen *et al.*, 2006), espectrometría de masas (Lee *et al.*, 2006a; Ranasinghe y Akhurst, 2002) o combinaciones de esta última con la técnica PCR (Sun *et al.*, 2008).

### **1.2.2 Ecología de *B. thuringiensis***

*B. thuringiensis* es un microorganismo que siempre ha sido asociado al suelo como nicho ecológico, ya que sus esporas permanecen viables durante largos periodos de tiempo, y porque se sabe que puede completar su ciclo biológico sin la presencia de insectos en suelos neutros o moderadamente ácidos (Saleh *et al.*, 1970). Sin embargo, también ha sido aislado de excrementos, de polvo en suspensión, de piel de animales, de aguas estancadas, de cosechas

de grano almacenadas, del filoplano de las plantas y de insectos muertos (Schnepf *et al.*, 1998). Por tal ubicuidad, y porque casi el 90% de los aislados de esta bacteria del suelo y del filoplano no poseen cristal, se ha considerado que *B. thuringiensis* es más bien un microorganismo saprófito que un patógeno de insectos *per se* (Ohba *et al.*, 2009).

Sin embargo, algunos autores postulan que aquellos aislados que sí presentan cristal son resultado de la existencia de una relación de simbiosis con las plantas, ya que la síntesis del cristal supone a la bacteria un elevado gasto energético. Así, mientras que *B. thuringiensis* se aprovecharía de los exudados de las plantas y de la ausencia de competencia bacteriana en el filoplano, al mismo tiempo defendería a su hospedador de la acción devoradora de los insectos (Smith y Couche, 1991). Se ha visto que la gran mayoría de insectos susceptibles a los cristales de *B. thuringiensis* pertenecen al género Lepidoptera, género en el que se incluyen muchas especies fitófagas que han llegado a considerarse plaga. De hecho, Eliot *et al.* (2002) retomaron la hipótesis de Smith y Couche, renombrándola “la hipótesis guardaespaldas” postulando que las plantas favorecen la presencia de *B. thuringiensis* en sus hojas para beneficiarse de la capacidad que tiene la bacteria de eliminar a los insectos defoliadores.

### **1.2.3 Ciclo biológico de *B. thuringiensis***

El ciclo biológico de *B. thuringiensis* presenta dos fases, la fase vegetativa o exponencial, y la fase de esporulación o estacionaria. Podríamos decir que la fase vegetativa empieza con la germinación de la espora de resistencia, para pasar a célula vegetativa. En esta fase, la bacteria, en forma de célula vegetativa, se multiplica por división celular bajo unas condiciones aeróbicas aunque es anaeróbica facultativa. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre los 26 y 30 °C, y en cuanto al pH, aunque no es una bacteria no

muy exigente con este parámetro, se considera que el intervalo óptimo oscila entre el 6.5 y 7.5 (Iriarte y Caballero, 2001).

En el momento en el que la población bacteriana de *B. thuringiensis* detecta que el medio de crecimiento se empobrece, se ponen en marcha todos los mecanismos biológicos de resistencia para asegurar su supervivencia. Empieza con un cambio de crecimiento exponencial a estacionario, en el que simultáneamente, se forma la endospora de resistencia y el cristal paraesporal que caracteriza a esta bacteria. Esta fase puede ser inducida en condiciones de laboratorio mediante el medios pobres como el CCY, que contiene sales de zinc, magnesio, manganeso, calcio y hierro.

### **1.3 Factores de virulencia producidos por *B. thuringiensis* durante la fase vegetativa**

Además de las  $\delta$ -endotoxinas, en las que se encuentran los cristales paraesporales (de las que hablaremos más tarde con más detalle) que como indica su nombre son sintetizados en la fase de esporulación, *B. thuringiensis* produce otros factores de virulencia pero durante la fase vegetativa de su ciclo biológico.

#### **1.3.1 Las $\beta$ -exotoxinas**

Esta toxina, también conocida como thuringiensina, por haber sido detectadas por primera vez en el serovar *thuringiensis*, es una molécula termoestable (15 min a 70 °C) de bajo peso molecular (701 Da), de naturaleza no proteica. Su estructura química se define como un derivado nucleotídico de adenina unido por una molécula de glucosa a un ácido fosfoalárico y se secreta al medio en forma soluble durante la fase vegetativa de la bacteria.

Su actividad tóxica radica en la inhibición de las RNA polimerasas ADN-dependientes compitiendo con el ATP inhibiéndose la síntesis de ARN (Sebesta y Horska, 1970; Vankova, 1978). Ello le confiere un amplio espectro de acción siendo activas no sólo contra insectos sino también contra mamíferos a elevadas dosis debido a su efecto mutagénico (Beebee *et al.*, 1972; Mackedonski *et al.*, 1972). De hecho, se observado una mayor presencia de  $\beta$ -exotoxina en aislados de *B. thuringiensis* de invertebrados que de aislados del agua, suelo, polvo o plantas (Espinasse *et al.*, 2003). Por todo esto la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999) se pronunció al respecto, prohibiendo el uso de cualquier cepa de *B. thuringiensis* productora de  $\beta$ -exotoxina en la formulación de productos insecticidas. No obstante, debido a su particular y eficaz actividad insecticida contra dípteros, se han utilizado productos insecticidas basados en este tipo de toxinas (Muscabac®, Farnos Group, Finlandia; Dudustop®, Univ. Helsinki/ICIPE; Bitoxibacillin®, Mikrobioprom, Rusia) para el control de larvas de mosca y mosquito en países del este de Europa y en África, mediante el empleo de dosis que fueran inocuas para el resto de organismos (Carlberg *et al.*, 1985; Carlberg, 1986)

La presencia de  $\beta$ -exotoxina puede ser determinada con bioensayos con la mosca común (*Musca domestica*) o mediante detección por cromatografía HPLC (Campbell *et al.*, 1987; Hernandez *et al.*, 2001). Otros estudios han demostrado que la producción de  $\beta$ -exotoxina está ligada a la presencia de los plásmidos portadores de los genes *cry*. Así, se ha publicado que las toxinas Cry actuarían de forma sinérgica con las  $\beta$ -endotoxinas en insectos resistentes a estas últimas (Glare y O'Callaghan, 2000).

### **1.3.2 Proteínas insecticidas vegetativas**

Este tipo de proteínas insecticidas, también llamadas proteínas Vip (*Vegetative insecticidal proteins*), representan el último grupo de proteínas insecticidas recién descubiertas de *B. thuringiensis*. Se clasifican en tres familias Vip1, Vip2

y Vip3 ([http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/vip.html](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html)). Las proteínas Vip se expresan a partir de la segunda mitad de la fase exponencial vegetativa y continúan expresándose en la fase de esporulación en algunas cepas de *B. thuringiensis*. Así como las  $\delta$ -endotoxinas son sintetizadas como cuerpos de inclusión paraesporales de naturaleza cristalina, las proteínas VIP son excretadas al medio y no forman parte del cristal paraesporal (Estruch *et al.*, 1996).

Las proteínas Vip1 y Vip2 son proteínas de 100 y 52 kDa que forman una proteína binaria con efecto insecticida contra algunas especies de coleópteros (Warren, 1997). Basado en su homología con otras toxinas binarias, se ha propuesto que la proteína Vip1 se uniría a un “receptor” específico de las células epiteliales de intestino medio y, como proteína multimérica, formaría un poro. Vip2, atravesaría ese poro y, basado en su homología con las ADP-ribosiltransferasas, modificaría la actina monomérica inhibiendo su polimerización (Carlier, 1990; Warren *et al.*, 1996). Vip3 no muestra homología con ninguna proteína conocida, sin embargo se conoce que esta proteína de 88.5 kDa es procesada en el intestino medio de los insectos para transformarla en la forma activa de 62 kDa, la cual es tóxica para diferentes especies de lepidópteros como *Agrotis ipsilon*, *Spodotera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* y *Helicoverpa armígera* (Estruch *et al.*, 1996; Hernandez-Martinez *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006b; Yu *et al.*, 1997). Este sistema es muy parecido al de las  $\delta$ -endotoxinas, sin embargo la clase de molécula diana y el tipo de poro que se forma parece ser lo que diferencia ambos mecanismos de acción (Bel *et al.*, 2013). Esta diferenciación es lo que hace interesantes a las proteínas Vip en los programas de gestión de resistencias de insectos plaga pues existen casos de determinados insectos plaga que han sido expuestos a una determinada  $\delta$ -endotoxina han desarrollado resistencia cruzada a otra  $\delta$ -endotoxina similar. Así pues, lo que estos programas plantean es intentar emplear a la vez dos proteínas tóxicas (tanto en formulados como en plantas transgénicas de *B. thuringiensis*), pero con diferentes modos de acción, con el objetivo de conseguir que el espectro

de acción se amplie y se minimice el fenómeno de resistencia cruzada (James, 2012). Esto mismo es lo que se busca al investigar con las toxinas Vip, pues se ha visto que insectos resistentes a determinadas  $\delta$ -endotoxinas han resultado ser susceptibles a las proteínas Vip (Fang *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Otros factores tóxicos

Además de las  $\delta$ -endotoxinas, *B. thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia. No son específicos y son producidos en las fases vegetativa y estacionaria de la bacteria. Entre estos factores de virulencia se encuentran hemolisinas citotóxicas sobre eritrocitos de vertebrados, y enterotoxinas implicadas en procesos de diarrea e infecciones somáticas similares a las de *B. cereus*; además también se han encontrado fosfolipasas, proteasas, quitinasas,  $\alpha$ -exotoxinas o exotoxinas termolábiles (Glare y O'Callaghan, 2000). Ninguno de estos factores de virulencia han dado positivo en pruebas de virulencia contra mamíferos, al comprobarse que su efecto tóxico (agudo o crónico), teratogénico, mutagénico o carcinogénico es prácticamente nulo, además de haberse hallado en cantidades muy pequeñas. En la siguiente dirección electrónica, <http://npic.orst.edu/index.es.html>, se puede encontrar una revisión más completa sobre la caracterización de los productos de *B. thuringiensis*.

También, existen una serie de inclusiones paraesporales proteicas que aunque se sintetizan durante la fase de esporulación, las incluiremos en este apartado por carecer de actividad insecticida. Estas inclusiones son las llamadas paraesporinas (PS). Presentan una baja homología con las  $\delta$ -endotoxinas y no son insecticidas, sin embargo, se caracterizan por demostrar una actividad anti-tumoral (Mizuki *et al.*, 1999), lo que las ha convertido en importante objeto de estudio. Este grupo de proteínas se clasifican en seis familias: de la PS1 a la PS6. Al igual que las  $\delta$ -endotoxinas, se activan mediante un procesado



proteolítico lo que les permite unirse a una molécula diana de la membrana plasmática de células tumorales. Acto seguido parece que las PS se oligomerizan y forman en la misma membrana un poro que desestabiliza el equilibrio osmótico de la célula tumoral. También se conoce que algunas de ellas tras su unión a membrana, lo que provocan es un aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, relacionado posiblemente con un proceso de apoptosis de la célula tumoral (Ohba *et al.*, 2009).

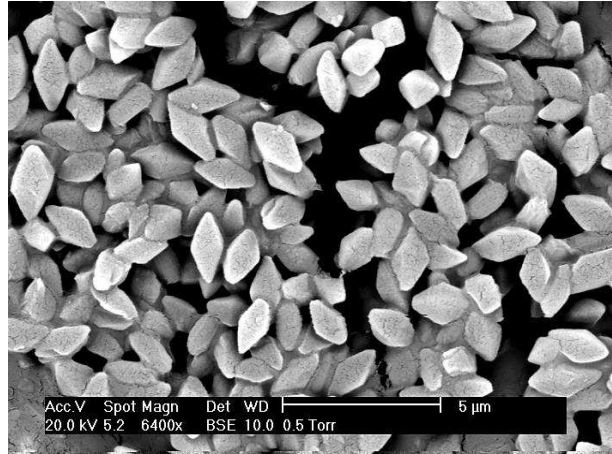
También existen una serie de proteínas denominadas Bel sintetizadas por *B. thuringiensis* que mejoran su actividad insecticida a través de la digestión de la mucina del epitelio intestinal de los insectos diana (Fang *et al.*, 2009).

## **1.4 Factores de virulencia producidos por *B. thuringiensis* durante la fase de esporulación**

### **1.4.1 Las $\delta$ -endotoxinas**

Las  $\delta$ -endotoxinas, toxinas Cry o ICPs son las que caracterizan a esta bacteria diferenciándola de otras especies formadoras de esporas muy cercanas a ella, como son *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Las toxinas Cry forman agregados en forma de inclusiones cristalinas en el interior de la bacteria en el momento de su esporulación. Cada uno de estos agregados puede contener más de una clase de toxina que se agrupan entre sí por puentes disulfuro (Jurat-Fuentes *et al.*, 2012). Los cristales adoptan diversas formas dependiendo de las clases de toxinas que los compongan, así existen los bipiramidales (Cry1) (**Fig. 2**), cuboidales (Cry2), rectangulares (Cry3A), irregulares (Cry3B), esféricos (Cry4A y Cry4B), y de tipo romboidal (Cry11A). Los genes que codifican las proteínas Cry, los llamados genes *cry*, están localizados en plásmidos de tamaño variable (Gonzalez *et al.*, 1981), aunque también algunos de ellos han sido observados en el cromosoma bacteriano (Kronstad *et al.*, 1983). Normalmente, estos genes se expresan durante la fase

estacionaria de la célula bajo el control transcripcional de factores  $\sigma$  dependientes de la esporulación.



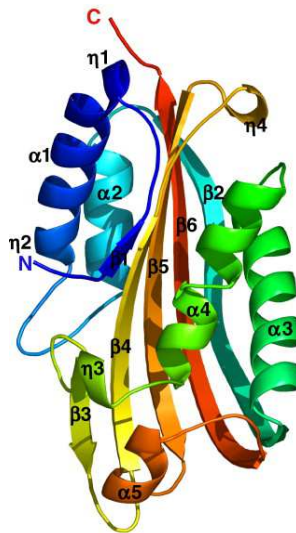
**FIGURA 2. Cristales bipiramidales y esporas paraesporales.** Cristales y esporas procedentes de la cepa T08025 de *B. thuringiensis* serovar *morrisoni* Fte. Imagen obtenida por microscopía electrónica por Jim Buckman.

La espora que produce *B. thuringiensis* es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por períodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios, puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo. Estudios han demostrado que las toxinas Cry pueden potenciar su actividad insecticida mediante su combinación con esporas de *B. thuringiensis*. El efecto sinérgico entre la espora y las  $\delta$ -endotoxinas se observó ya hace años (Burges *et al.*, 1975), aunque aún hoy no se conoce con exactitud el porqué de este mecanismo. Algunos autores proponen que se debe a que el insecto además de morir por la toxicidad de los cristales, también muere por la septicemia que se produce en la hemolinfa de las larvas al germinar las esporas que han ingerido junto con los cristales. Sin embargo, parece ser que proteínas que recubren el exosporio

de la espora desempeñan parte de este sinergismo al observarse que, tras irradiar las esporas con luz UV, aún se potenciaba la toxicidad de las toxinas frente al lepidóptero plaga *Plodia interpunctella*, esto es, se impedía la septicemia tras la irradiación pero las moléculas de la pared de las esporas aún seguían siendo funcionales (Johnson *et al.*, 1998). En el lepidóptero plaga *Plutella xylostella* también se encontró tal sinergismo, de tal forma que la toxicidad de las proteínas Cry puras frente a este insecto aumentó hasta un 146% (Miyasono *et al.*, 1994). De hecho, Tang *et al.* (1996) sugirió que de alguna forma las toxinas permiten la entrada de las esporas a la hemolinfa del este insecto, tras unirse a las células epiteliales del intestino medio. También se ha observado que durante la germinación de las esporas se secretan factores tóxicos que pueden estar involucrados también en el proceso tóxico (Salamitou *et al.*, 2000). Sin embargo, esta relación espora/cristal no es un fenómeno universal, ya que depende de la cepa del insecto, del tipo de espora y toxina utilizada, de sus concentraciones, así como de los ingredientes utilizados en la formulación de los productos (Liu *et al.*, 1998).

#### 1.4.2 Las proteínas Cyt

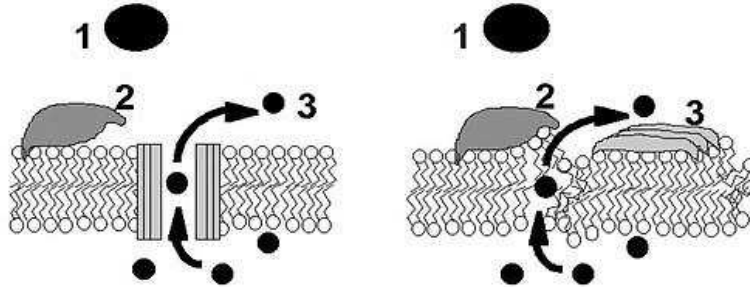
Las toxinas Cyt, o endotoxinas citolíticas, son también  $\delta$ -endotoxinas pero no presentan homología ni de secuencia ni de estructura terciaria con las toxinas Cry. Son proteínas pequeñas, de unos 25 kDa y actúan de forma sinérgica con las toxinas Cry. Presentan un único dominio compuesto por hojas  $\beta$  plegadas recubiertas por dos capas de hélices  $\alpha$  (**Fig. 3**) (Li *et al.*, 1996). Son tres las proteínas Cyt de las que se ha determinado su estructura tridimensional: Cyt2Aa (Li *et al.*, 1996), Cyt2Ba (Cohen *et al.*, 2008) y Cyt1Aa (Cohen *et al.*, 2011).



**FIGURA 3. Estructura tridimensional del monómero Cyt2Ba.** Consta de un único dominio  $\alpha/\beta$  con una hoja  $\beta$  rodeada por dos agrupaciones de hélices  $\alpha$ . Se indican los elementos secundarios, así como los extremos N- y C-terminal. Fte.: Cohen *et al.*, (2008)

Su nombre se debe a que poseen actividad citolítica y hemolítica inespecífica tanto a invertebrados como también a vertebrados, ya que poseen afinidad por componentes inespecíficos de membrana, concretamente por ácidos grasos insaturados (Thomas y Ellar, 1983a; Thomas y Ellar, 1983b). Para que se lleve a cabo esta actividad las toxinas Cyt deben activarse, pues son sintetizadas como protoxinas inactivas. El paso a un estado activo se realiza mediante una proteólisis N- y C-terminal (Al-yahyaee y Ellar, 1996; Koni y Ellar, 1994). Su modo de acción de destrucción celular aún es incierto, aunque se conoce que presentan una alta afinidad por los lípidos de la membrana celular sin requerir la presencia de un receptor para unirse a ella. Se barajan dos hipótesis (**Fig. 4**), una propone que la destrucción de la membrana celular se realiza mediante la formación de un poro (Promdonkoy y Ellar, 2003; Promdonkoy y Ellar, 2005), y la otra mediante una actividad detergente (Butko, 2003). En la primera hipótesis se sugiere que las dos hélices  $\alpha$  se desplazan para permitir la inserción y oligomerización de las hojas  $\beta$  en la membrana con el fin de formar un poro. El

segundo modelo sugiere que la parte hidrofílica de las hélices de los monómeros se unen entre sí formando un oligómero que actuaría inespecíficamente sobre las membranas, disgregándolas como un detergente.



**FIGURA 4. Ilustración de los dos modelos de acción de CytA propuestos.** (1) La toxina en su forma soluble y situada en el medio extracelular se aproximaría a la membrana celular que, a través de un cambio conformacional, se situaría sobre la membrana lipídica. (3) Posteriormente, se insertaría en ella y junto con otras proteínas Cyt formaría un oligómero por el que se abriría un poro. La otra hipótesis que se propone es que estos oligómeros podrían formar agregados en la superficie de membrana con la capacidad de fragmentarla en complejos proteico-lipídicos. A través de los dos procesos propuestos la célula sufriría un desequilibrio osmótico. Fte.: Butko, (2003).

Se piensa que las proteínas Cyt podrían actuar sinérgicamente con las proteínas Cry, esta idea procede de estudios como el de Wirth *et al.* (1997), que demostraron que poblaciones resistentes del mosquito *Culex quinquefasciatus* frente a determinadas toxinas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba y/o Cry11Aa) perdieron tal resistencia bajo una aplicación conjunta de estas toxinas Cry junto con la Cyt1Aa. De hecho, otros estudios (Perez *et al.*, 2005) sugirieron que las proteínas Cyt podrían actuar como moléculas receptoras para anclar las proteínas Cry a la membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto. Esta conclusión fue lanzada al observar que la unión de la Cry11Aa a vesículas de la membrana epitelial intestinal del mosquito *Aedes aegypti* fue mejorada al añadir toxinas Cyt1Aa; además, Cry11Aa se une a Cyt1Aa con el mismo loop ( $\alpha$ -8) del dominio II que usa para interactuar con los receptores de la membrana epitelial del intestino medio de

las larvas del mosquito (Fernandez *et al.*, 2005). Finalmente se sugiere que la no aparición aún de resistencia en campo, de poblaciones de mosquito tratadas con formulados de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (produce Cyt1Aa, Cyt2Ba, Cyt1ca, Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cry10A) (Federici *et al.*, 2003; Jouzani *et al.* 2008; Perez *et al.*, 2005), se debe que las proteínas Cyt que forman parte de su cristal y actúan de forma sinérgica con las Cry, mejorando así su actividad insecticida (Becker, 2000). Además parece que como en el caso de las toxinas Cry necesitan de un paso previo de oligomerización para poder ser activas (Lopez-Diaz *et al.*, 2013).

### 1.5 Clasificación de las $\delta$ -endotoxinas

En un principio, Höfte y Whiteley (1989), elaboraron una primera clasificación de las  $\delta$ -endotoxinas basándose en el insecto diana por el que se caracterizaba su actividad insecticida. Así pues, las toxinas CryI eran todas aquellas que presentaban actividad insecticida contra lepidópteros, las CryII eran proteínas activas contra los lepidópteros y dípteros, las CryIII contra insectos coleópteros, y finalmente, las toxinas CryIV activas contra dípteros. Posteriormente, se propusieron dos nuevos grupos, las CryIV y CryV, activas contra nematodos. Sin embargo, mediante este tipo de clasificación no tardaron en surgir ciertas incongruencias al encontrar genes *cry* con una elevada homología entre ellos pero que, posteriormente, codificaban para proteínas con actividades insecticidas diferentes. Un ejemplo claro fue el gen *cryIIB*, homólogo con el gen *cryIIA*, el cual teóricamente tendría que codificar para una toxina CryIIB tóxica para lepidópteros y dípteros, sin embargo, su toxicidad frente a dípteros no pudo ser demostrada. Otros ejemplos que evidenciaban tales incongruencias, fueron las toxinas CryIC y CryIB. La primera de ellas resultó ser tóxica frente a dípteros y lepidópteros (Smith y Ellar, 1994), la segunda se caracterizó por una actividad insecticida frente a lepidópteros y coleópteros (Bradley *et al.*, 1995). Esto propició la búsqueda de un nuevo sistema de clasificación que pudiera facilitar su nomenclatura. Así pues, Crickmore *et al.* (1998) propusieron

organizar las  $\delta$ -endotoxinas basándose en la homología de su secuencia primaria. El procedimiento seguido por estos autores fue la alineación múltiple de las secuencias mediante el programa informático CLUSTALW, cuyo resultado era analizado por el sistema NEIGHBOR que traducía el porcentaje de homología de las secuencias (presentado en matrices de distancia) en árboles filogenéticos. A partir de esta nueva clasificación se propuso una nueva clasificación, que es la que hasta el momento se viene utilizando, la cual cambiaba los números romanos por los arábigos. De este modo, y a partir de ese momento, la definición de  $\delta$ -endotoxinas que se propuso fue la de toda aquella proteína paraesporal de *B. thuringiensis* que mostrase actividad insecticida, o de toda aquella proteína que presentase una elevada homología con las toxinas Cry.

Según esta nueva clasificación, las  $\delta$ -endotoxinas se ordenan en tres niveles estableciendo cuatro rangos según su grado de homología aminoacídica. De este modo la nomenclatura que reciben las toxinas va en función del nivel en que se encuentre. Así, el número arábigo designa el primer rango, que corresponde hasta el 45% de homología (ej. Cry1). El segundo rango cataloga a las proteínas con una letra mayúscula, correspondiente a una homología del 45 al 78% (ej. Cry1A). El tercero representa una homología de entre el 78 y 95% y se simboliza con una letra minúscula (ej. Cry1Ab). El cuarto y último rango representaría una homología mayor del 95%, que son los denominados holotipos, y vendría indicado con un número arábigo final (ej. Cry1Ab7). En esta clasificación también se encuentran las proteínas Cyt, cuya baja homología queda representada en el dendograma al situarse como grupo aparte de las proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1998). Hasta el momento y de acuerdo con este sistema, existen alrededor de 299 holotipos entre proteínas Cry y Cyt. Por homología de secuencia también se incluyen proteínas cristalinas sintetizadas por otras bacterias como: Cry16 y Cry17 de *Clostridium bif fermentans*, Cry18 de *Bacillus popilliae*, Cry43 de *Paenibacillus lentimorbis* y la toxina binaria Cry48/Cry49 producida por *Bacillus sphaericus*.

Esta lista es revisada y actualizada de forma periódica por un comité creado para tal propósito (Crickmore *et al.*, 2014). Se puede acceder a ella a través de la siguiente dirección electrónica: <http://www.btnomenclature.info>. Actualmente las proteínas Cry quedan organizadas en tres grupos diferentes que carecen de una relación filogenética y que presentan diferentes mecanismos de acción. Estos grupos son: el de las proteínas Cry con tres dominios, el de las proteínas Cyt, las de tipo Mtx, las de tipo Bin y el de otras que aún están por identificar (Cry6, Cry37, Cry22, Cry34). Las proteínas tipo Mtx y Bin son similares a las toxinas Mtx y Bin producidas por *B. sphaericus*, con la salvedad de que las producidas por éste son tóxicas frente a mosquitos y las de lo son frente a larvas de coleópteros.

La caracterización de las proteínas de *B. thuringiensis* no se basa únicamente en sus secuencias aminoacídicas, también incluye averiguar su actividad pesticida mediante bioensayos. Para recopilar toda esta información, en 1998 se elaboró una base de datos en la que se detalla la especificidad tóxica de todas y cada una de las toxinas de *B. thuringiensis* descritas hasta el momento. Esta base de datos se puede consultar en la siguiente dirección electrónica: <http://www.glfsc.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>. Frankenhuyzen recopila y resume toda la información obtenida en esta base de datos (van Frankenhuyzen, 1993; van Frankenhuyzen, 2009). Un ejemplo de este trabajo es la **tabla 1**, donde se indica la actividad insecticida de las diferentes familias de toxinas Cry y Cyt frente a órdenes de insectos específicos.



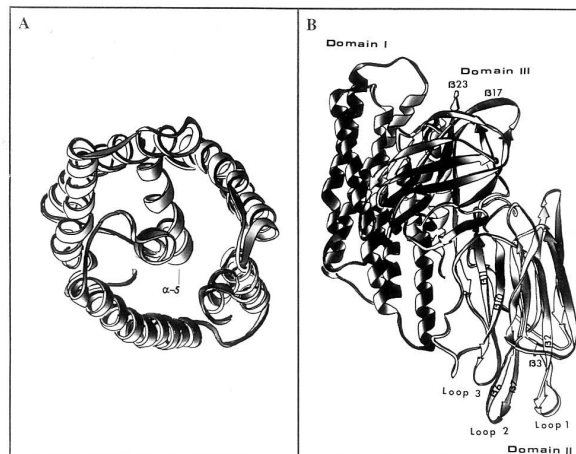
		Coleoptera	Collembola	Diptera	Blattaria	Hemiptera	Hymenoptera	Isoptera	Lepidoptera	Neuroptera	Orthoptera	Siphonoptera	Thysanoptera	Echinostomida	Rhabditida	Cancer cells				Coleoptera	Collembola	Diptera	Blattaria	Hemiptera	Hymenoptera	Isoptera	Lepidoptera	Neuroptera	Orthoptera	Siphonoptera	Thysanoptera	Echinostomida	Rhabditida	Cancer cells	
Cry	1A																		Cry	19B															
Cry	1B	■							■										Cry	20A															
Cry	1C			■															Cry	21A															
Cry	1D																		Cry	22A	■				■		■								■
Cry	1E																		Cry	22B															
Cry	1F																		Cry	23A	■														
Cry	1G																		Cry	24B															
Cry	1H																		Cry	24C															
Cry	1I	■																	Cry	27A			■												
Cry	1J	■																	Cry	29A															
Cry	1K																		Cry	30A															
Cry	2A																		Cry	30B															
Cry	3A										■								Cry	30C															
Cry	3B	■																	Cry	31A															
Cry	3C																		Cry	32A															
Cry	4A																		Cry	32B															
Cry	4B																		Cry	32C															
Cry	5A																		Cry	32D															
Cry	5B																		Cry	33A															
Cry	6A																		Cry	34A	■														
Cry	6B																		Cry	34B															
Cry	7A	■																	Cry	35A															
Cry	7B	■																	Cry	35B															
Cry	8A	■																	Cry	36A															
Cry	8B	■																	Cry	37A															
Cry	8C	■																	Cry	38A															
Cry	8D	■																	Cry	39A															
Cry	8E	■																	Cry	40A															
Cry	8F	■																	Cry	40B															
Cry	8G	■																	Cry	41A															
Cry	9A	■																	Cry	42A															
Cry	9B	■																	Cry	43A	■														
Cry	9C	■																	Cry	43B															
Cry	9D	■																	Cry	44A															
Cry	9E	■																	Cry	45A															
Cry	10A	■																	Cry	46A															
Cry	11A	■																	Cry	47A															
Cry	11B	■																	Cry	48A															
Cry	12A	■																	Cry	49A															
Cry	13A	■																	Cry	51A															
Cry	14A	■																	Cry	55A															
Cry	15A	■																	Cyt	1A															
Cry	16A	■																	Cyt	1B															
Cry	17A	■																	Cyt	2A															
Cry	18A	■																	Cyt	2B															
Cry	19A	■																	Cyt	2C	■														

TABLA 1. Actividad insecticida de las diferentes familias de toxinas Cry y Cyt frente a determinados órdenes de insectos: activa ■ no activa □ posiblemente activa ◻. Fte.: Frankenhuysen, (2009).

### 1.6 Estructura de las $\delta$ -endotoxinas

Hasta la fecha, se ha determinado la estructura terciaria mediante cristalografía de rayos X, las siguientes toxinas Cry: Cry1Aa (especificidad: Lepidoptera), Cry2Aa (especificidad: Lepidoptera-Diptera), Cry3Aa (especificidad: Coleoptera), Cry3Bb (especificidad: Coleoptera), Cry4Aa (especificidad: Diptera), Cry4Ba (especificidad: Diptera) y Cry8Ea1 (especificidad: Coleoptera) (Boonserm *et al.*, 2005; Boonserm *et al.*, 2006; Galitsky *et al.*, 2001; Grochulski

*et al.*, 1995; Guo *et al.*, 2009; Li *et al.*, 1991; Morse *et al.*, 2001). Aunque cada una de estas proteínas es tóxica frente diferentes órdenes de insectos, todas ellas presentan una estructura terciaria muy parecida con tres dominios proteicos (Bravo, 1997; Li *et al.*, 1991) (Fig. 5). El dominio N-terminal (dominio I) se compone de siete hélices  $\alpha$ . De todas ellas, la número cinco es hidrofóbica quedando rodeada por el resto que son de carácter antipático formando un anillo. El dominio II está formado por tres hojas  $\beta$  paralelas, y el dominio III es un  $\beta$  sándwich de dos hojas  $\beta$  antiparalelas.



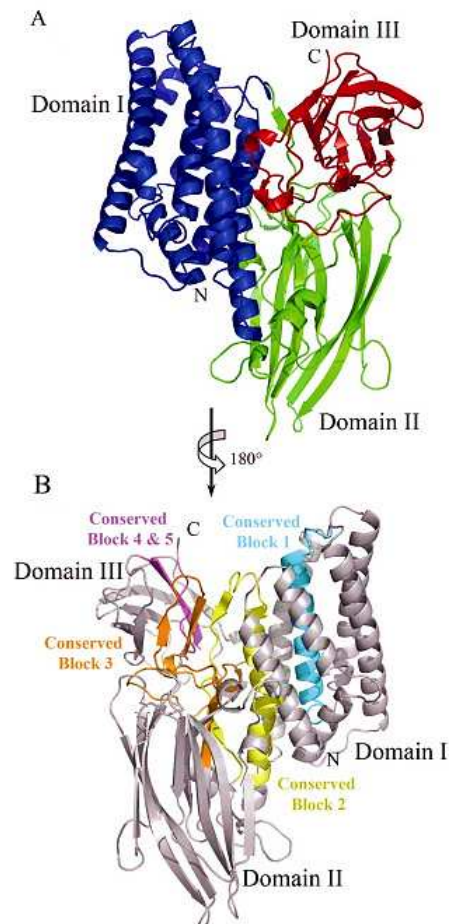
**FIGURA 5. Estructura tridimensional de la proteína Cry3A.** (A) Representación esquemática en planta de la hélice  $\alpha$ -5 del dominio I rodeada por el resto de lazos y  $\alpha$  hélices. (B) Organización tridimensional de los tres dominios en los que se muestra los lazos 1, 2 y 3 del dominio II expuestos en superficie, (formando un extremo de la proteína) y las hojas  $\beta$  las cuales quedan en una posición más interna en el dominio III ( $\beta$ -17 y  $\beta$ -23). Fte.: Li *et al.*, (1991).

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cry ha revelado la presencia de cinco bloques de aminoácidos altamente conservados en la mayoría de proteínas Cry a lo largo de toda su secuencia, y de tres bloques adicionales en el extremo C-terminal de algunas proteínas Cry (Hofte y Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998). Mediante este alineamiento también se

ha observado una determinada diversidad en cuanto a la longitud de las toxinas, un gran grupo de ellas presenta el doble de longitud al resto (de 70 a 130 KDa) que se corresponde con una extensión de la parte C-terminal. Esta parte no contiene ninguno de los bloques conservados, se cree que su función está relacionada con la formación y estabilidad del cristal mediante la formación de puentes disulfuro.

El bloque 1 está formado por la  $\alpha$ -hélice central del dominio I, el bloque 2 se localiza entre los dominios I y II, asimismo, la última lámina del dominio II y la primera del dominio III constituyen el bloque 3 (**Fig. 6**). Finalmente, los bloques 4 y 5 están compuestos respectivamente de las láminas  $\beta$ -centrales antiparalelas del dominio III (**Fig. 6**) (Yamamoto y Dean, 2000). Estos cinco bloques conservados explicarían la similitud del modo de acción de todas las proteínas Cry, además de que podrían ser determinantes para la estructura globular de la proteína (Aronson y Shai, 2001).

Algunas familias de  $\delta$ -endotoxinas no presentan la estructura de tres dominios y se han clasificado de forma independiente. Algunos ejemplos son las proteínas Cyt, las de tipo Mtx y Bin, así como las Cry6, Cry37, Cry22 y Cry34.



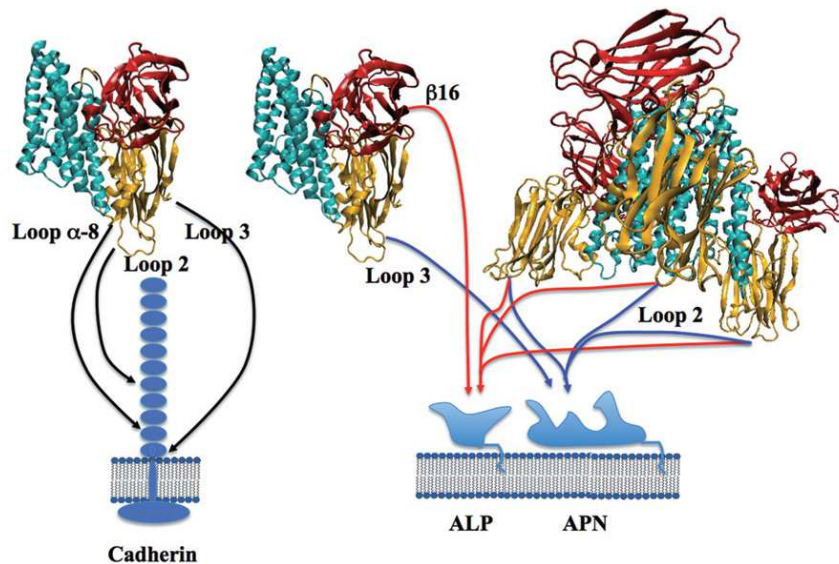
**FIGURA 6. Estructura tridimensional de la toxina Cry8Ea1.** (A) El dominio I se representa de color azul, el dominio II en verde y el dominio III en rojo. (B) Los diferentes bloques conservados son coloreados y etiquetados de forma distinta, así pues, el bloque 1 se representa en cian, el bloque 2 en amarillo, el 3 en naranja y el bloque 4-5 en violeta. Fte.: Guo *et al.*, (2009).

En líneas generales se propone que el papel que juega cada dominio sería el siguiente. El dominio I es el que se inserta en la membrana de las células epiteliales formando el poro. De hecho, mutaciones puntuales en la hélice 5 $\alpha$  de la toxina Cry1Ac afecta a la toxicidad de la toxina sin intervenir en el proceso de unión a vesículas de membrana (Wu y Aronson, 1992). Además, el dominio I de las toxinas Cry tiene homología estructural con dominios de otras proteínas

formadoras de poros como la colicina A o la toxina diftérica (Parker y Pattus, 1993).

El dominio II es de los que más se diferencia entre las toxinas. Al componer su estructura tridimensional se observa que presenta tres lazos (**Fig. 7**), los cuales se ha comprobado que están involucrados en la unión a la membrana de las células intestinales de los insectos, pues mutaciones en estas regiones han conllevado la pérdida de unión de la toxina Cry1Aa, Cry1Ab y Cry3A en vesículas de membrana de las células intestinales de *B. mori*, *M. sexta* y *Tenebrio molitor*, respectivamente (Lu *et al.*, 1994; Rajamohan *et al.*, 1996b; Wu y Aronson, 1992; Wu y Dean, 1996). Además, este dominio tiene homología estructural con algunas proteínas que se unen a carbohidratos del tipo vitelina y lectina (de Maagd *et al.*, 2003).

El dominio III parece que estabiliza la estructura globular de las toxinas (Grochulski *et al.*, 1995), e incluso también se le ha visto implicado en la inserción a membrana y formación de poro en algunos insectos (Dean *et al.*, 1996). Sin embargo, muchos estudios lo involucran en la unión de las toxinas a membrana, e incluso, con la especificidad de las moléculas de anclaje (**Fig. 7**) (Aronson *et al.*, 1995; Bosch *et al.*, 1994; Bravo *et al.*, 2013; Herrero *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1995b). De hecho, este dominio presenta una similitud estructural con otras proteínas que unen a carbohidratos como la 1,4  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucanasa y xilanasa U (de Maagd *et al.*, 2003).



**FIGURA 7.** Regiones de unión en las formas monoméricas y oligoméricas en Cry1Ab a los receptores caderina, fosfatasa alcalina (ALP) y aminopeptidasa N (APN) en *M. sexta*. La forma monomérica corresponde a la estructura tridimensional de Cry1Aa y la estructura oligomérica corresponde a la estructura trimérica Cry4Ba. En la forma monomérica de la toxina Cry estarían implicados en la unión el lazo 3 y la hoja  $\beta 16$  de los dominios I y II, respectivamente. En cambio en la forma oligomérica estaría implicado el lazo 2 del dominio I. Fte.: Bravo *et al.* (2012).

Estudios filogenéticos demuestran que mientras los dominios I y II han evolucionado de forma independiente, el dominio III ha sido intercambiado entre las toxinas. Un claro ejemplo se encuentra en aquellas toxinas que tienen doble especificidad (frente coleópteros y lepidópteros), o en aquellos trabajos en los que, mediante intercambios del dominio III entre diferentes toxinas Cry1A, se ha llegado a cambiar el insecto diana (Bosch *et al.*, 1994; de Maagd *et al.*, 2000) incluso la toxicidad (Avisar *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1995b). Todo esto podría explicar la gran variedad de toxinas Cry, todas con un mismo modo de acción, pero con diferentes especificidades y toxicidades.

## 1.7 Modo de acción de las toxinas Cry

La comprensión del modo de acción de las toxinas Cry es fundamental, tanto para el diseño de estrategias que hagan más efectivo y duradero el mecanismo insecticida, como para prevenir el desarrollo de insectos resistentes.

Existen una serie de etapas por las que las toxinas Cry deben pasar para poder llevar a cabo su efecto tóxico. Estas etapas pueden nombrarse de la siguiente manera: ingestión del cristal, solubilización, procesamiento de las protoxinas o activación, unión a una proteína de anclaje o receptor, inserción en la membrana, formación de poros y lisis celular (Schnepf *et al.*, 1998).

La sintomatología que se observa a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de *B. thuringiensis* son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y, finalmente, la muerte (**Fig. 8**) (Aronson *et al.*, 1986). Los estudios histopatológicos han mostrado que las células epiteliales del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente y, en particular, las microvellosidades apicales que se destruyen en su totalidad. Los efectos en el otro tipo de células de las que está constituido el intestino medio de los lepidópteros, las células caliciformes, son más lentos, pero en ellas también se ha observado citólisis (Bravo *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 1985). A nivel microscópico se han observado cambios en el retículo endoplasmático, en las mitocondrias, alteraciones en el transporte de iones y de glucosa, en la captación de oxígeno y en una pérdida de ATP (Aronson *et al.*, 1986).



**FIGURA 8. Larvas de *Trichoplusia ni*.** A la izquierda se observa una larva de *T. ni* en estado natural. A la derecha se observa el aspecto que toma la larva al morir tras la ingesta de Bt.  
Fte.: [http://thailand.ipm-info.org/bt/Bt\\_Basics.htm](http://thailand.ipm-info.org/bt/Bt_Basics.htm)

### 1.7.1 Ingestión del cristal

Las toxinas Cry actúan exclusivamente sobre las larvas de insectos por ingestión y no por contacto. Así pues, los cristales después de ser ingeridos por el insecto, pasan a través del primer tracto intestinal del insecto (estomodeo), prácticamente intactos, hasta el intestino medio (mesenterón) donde se digieren, pues es la principal región de producción de enzimas digestivos y de absorción de los alimentos.

### 1.7.2 Solubilización de los cristales Bt

Las condiciones alcalinas que se dan en el intestino medio de las larvas de lepidópteros, dípteros y algunos coleópteros, permiten que se digieran mejor los tejidos vegetales ingeridos, así como también que se disuelvan mejor los taninos que contiene el material vegetal. Este medio alcalino junto con las condiciones reductoras, también características del medio intestinal, permiten que los cristales de *B. thuringiensis* se solubilicen. Este proceso comporta la rotura de los puentes disulfuro existentes entre las cadenas que forman las



protoxinas y que mantienen su estructura terciaria (Bietlot *et al.*, 1990), además de decidir la toxicidad del cristal (Du *et al.*, 1994). De esta manera, las proteínas del cristal, llamadas protoxinas, quedan más accesibles a la acción de las proteasas digestivas responsables de su activación, lo que a su vez facilita su solubilidad, de ahí que ambos procesos interactúen entre sí.

### 1.7.3 Activación

Una vez solubilizadas, las protoxinas inactivas que han formado parte del cristal, son activadas gracias a un proceso enzimático de hidrólisis que las procesa liberando un determinado número de aminoácidos en cada uno de sus extremos N-terminal y/o C-terminal. Este proceso de activación se lleva a cabo por la actividad enzimática de las proteasas que existen en el intestino medio de los insectos. Estas proteasas son mayoritariamente del tipo serínproteasas: tripsinas, quimotripsinas y elastasas, aunque también se encuentran las carboxipeptidasas y las aminopeptidasas. La activación de las Cry1 se lleva a cabo mediante el corte del extremo N-terminal que se sitúa entre los primeros 25-30 aminoácidos, y del extremo C-terminal que se sitúa en el segundo tercio de la proteína, a unos 500-600 residuos. De esta forma, las proteínas del grupo Cry1 que tienen un tamaño de alrededor 130 kDa, pasan a tener un tamaño de unos 60 kDa, casi la mitad de su tamaño inicial (Choma *et al.*, 1990). Sin embargo, las proteínas cristalinas de menor tamaño, como las de los grupos Cry2 y Cry3 (alrededor de 70 kDa), presentan un tamaño similar tras su activación.

Tal y como ocurre en el proceso de solubilización, el procesado proteolítico para la activación de las toxinas también decide su perfil tóxico. De hecho, en el trabajo de Haider *et al.* (1986) se describe una toxina Cry aislada de *B. thuringiensis* var. *colmeri*, que resultó ser activa frente lepidópteros y dípteros; sin embargo, cuando fue activada con el jugo intestinal de lepidópteros únicamente fue tóxica frente a éstos. De la misma forma, cuando

fue activada con el jugo intestinal de dípteros fue únicamente tóxica frente insectos de este orden.

#### **1.7.4 Paso a través de la membrana peritrófica**

La membrana peritrófica se halla en el intestino medio de los insectos. Se trata de una membrana quitinosa cuya función es la de separar el alimento de las células epiteliales, protegiéndolas del efecto abrasivo del alimento; además, las resguarda de posibles ataques víricos, bacterianos y de infecciones por parásitos (Wang y Granados, 2001).

No todas las toxinas Cry pueden atravesar la membrana peritrófica ya que actúa como filtro dejando únicamente paso a moléculas de tamaño inferior a 60kDa (Adang y Spence, 1981). En muchos trabajos se ha visto un aumento de la toxicidad de las proteínas Cry tras su ingesta al ser añadidas a quitinasas (Regev *et al.*, 1996) o a moléculas virales (Granados *et al.*, 2001) capaces de lisar la membrana peritrófica de determinados insectos lepidópteros. Mediante la lisis de la membrana peritrófica se aumenta la permeabilidad a las toxinas Cry permitiendo que ejerzan su acción tóxica y por tanto, que aumente su eficacia insecticida. De hecho, se han aislado algunas cepas de *B. thuringiensis* que producen de forma natural quitinasas que mejoran la actividad tóxica de las toxinas Cry que sintetizan (Sampson y Gooday, 1998).

#### **1.7.5 Unión a la membrana**

Una vez el cristal es ingerido por el insecto, solubilizado en el lumen del intestino medio y activadas las protoxinas que lo forman, el siguiente paso es la unión específica al epitelio del intestino medio del insecto, considerado como el tejido diana de las toxinas. Tres moléculas de membrana, también llamadas receptores de membrana o moléculas de anclaje, han mostrado ser determinantes para tal especificidad mayoritariamente en lepidópteros, estas

son: las aminopeptidasas N (APN), las caderinas y el complejo transportador ABC. Otras proteínas candidatas a receptores de las toxinas Cry son: la fosfatasa alcalina (ALP) (Fernandez *et al.*, 2006; Jurat-Fuentes y Adang, 2004), un glicoconjugado de 270 kDa (Valaitis *et al.*, 2001), una proteína de 252 kDa (Hossain *et al.*, 2004), las serín-hidrolasas (Gunning *et al.*, 2005) e isoenzimas de manosa fosfato isomerasa (MPI) (Heckel *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 2001a). Hablaremos detenidamente de ellas en los siguientes apartados.

También se está trabajando en la búsqueda de los receptores vinculados en la unión de proteínas Cry en nematodos. El interés despertado radica en que ciertos nematodos también son susceptibles a la acción tóxica de las proteínas Cry, como son los casos de los parásitos intestinales *Nippostrongylus brasiliensis* y *Trichostrongylus colubriformis* (Bone, 1989). De hecho, estudios realizados con el nematodo modelo experimental *Caenorhabditis elegans*, proponen una serie de glicolípidos como receptores de las toxinas Cry (Griffitts *et al.*, 2001; Griffitts *et al.*, 2005). Todos estos avances han planteado utilizar también las toxinas Cry en el control de parásitos tanto de vegetales como de plantas (Wei *et al.*, 2003).

Otros autores apuntan, mediante el sistema de análisis MALDI-TOF, que otras moléculas podrían estar actuando como receptores, tras comparar el perfil proteico de una cepa resistente con otra susceptible de la misma especie de insecto (Candas *et al.*, 2003; McNall y Adang, 2003).

#### **1.7.5.1 Unión reversible e irreversible de las toxinas Cry**

La cinética de unión de las toxinas Cry a la membrana epitelial es bifásica, con una fase de unión reversible y otra de unión irreversible (Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995; Sanchis *et al.*, 1994; Van Rie *et al.*, 1989). Se cree que la parte irreversible refleja el momento en el que la toxina se ha insertado en la membrana. Estudios de unión con las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab con vesículas preparadas a partir de células del ribete en cepillo (BBMV del inglés *Brush*

*Border Membrane Vesicle*) del intestino de *B. mori*, revelaron que la proporción de los dos tipos de unión fueron diferentes. La toxina Cry1Aa presentaba un porcentaje mayor de unión irreversible que la Cry1Ab, relacionado con su mayor toxicidad (Ihara *et al.*, 1993). El mismo caso se encontró con *Lymantria dispar*, pues las toxinas con mayor toxicidad presentaban un mayor porcentaje de unión irreversible (Liang *et al.*, 1995). Así pues, se puede decir que si se encuentra toxicidad sí existe unión reversible-irreversible de la toxina a membrana, pero el hecho de que exista unión no significa que haya toxicidad debido a que se puede dar únicamente la fase de unión reversible sin llegar a la irreversible.

En el proceso de unión no sólo se necesita de la presencia de una molécula de anclaje a membrana o receptor, sino que la misma toxina también juega un papel fundamental en esta unión mediante la relación de cada uno de sus dominios con el proceso de unión reversible e irreversible. En general, se propone que una vez la toxina se ha unido al receptor, se desencadenan una serie de cambios conformacionales que llevan a exponer el dominio I para que interactúe y se inserte en la membrana apical de las células intestinales de forma irreversible. De hecho, diversos estudios consideran que el dominio I interviene en la unión irreversible de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac a la vez que, en la formación del poro en *Manduca sexta* tras observar que mutaciones dirigidas a la eliminación de la unión irreversible daban como resultado una pérdida significativa de toxicidad frente al insecto (Chen *et al.*, 1995; Hussain *et al.*, 1996).

En el caso del dominio II, éste juega un papel fundamental en la unión tanto reversible como irreversible. Mutaciones dirigidas en el lazo 1 y 3 del dominio II de la toxina Cry3A afectaban a su unión reversible, pues pierde su habilidad para unirse al receptor y con ello su toxicidad frente al coleóptero *Tenebrio molitor*. Sin embargo, mutaciones en el lazo 3 afectaban únicamente a la unión irreversible de la toxina (Wu y Dean, 1996).

Otros estudios sobre la toxina Cry1Aa, sugieren que dos Arg situadas en el dominio II de esta toxina, son cruciales para el reconocimiento y unión reversible en *M. sexta* y *L. dispar* debido a su carga positiva (Lee *et al.*, 2001). De hecho, una delección en el lazo 2 de esta toxina provocaba una pérdida sustancial de la unión reversible con el receptor y de toxicidad frente *B. mori* (Lu *et al.*, 1994)

En el caso de la toxina Cry1Ab, mediante experimentos de mutagénesis dirigida, se sabe que en el lazo 2 del dominio II existe un residuo hidrofóbico aromático muy importante para la unión irreversible de la toxina a los lepidópteros *M. sexta* y *H. virescens* (Rajamohan *et al.*, 1996b).

Mutaciones en el lazo 1 y 3 de la toxina CryAc no afectan a los parámetros de unión de la toxina, pero sí que disminuyen la toxicidad frente *M. sexta*, por lo que se deduce que las mutaciones producen cambios en la unión irreversible, reduciendo así su potencial tóxico. El lazo 2 estaría relacionado con la unión reversible (Smedley y Ellar, 1996).

Aunque, en general, se le atribuye al dominio II la responsabilidad de reconocimiento a un receptor de membrana, algunos trabajos con el lepidóptero *M. sexta*, lo han involucrado también en la formación de poro (Nair *et al.*, 2008).

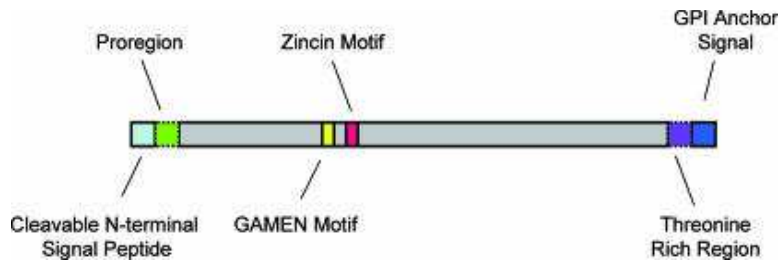
Además, aunque comentaremos este punto más adelante (apartado 1.7.6.1), es un hecho aceptado de la existencia de una oligomerización previa entre las toxinas Cry antes de insertarse en la membrana (Gomez *et al.*, 2002; Munoz-Garay *et al.*, 2006; Munoz-Garay *et al.*, 2009; Rausell *et al.*, 2004a; Rausell *et al.*, 2004b). El primer grupo en establecer una relación directa entre la unión irreversible y la formación de oligómeros fue el de Aronson *et al.* (Aronson *et al.*, 1999) para las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab frente los insectos *M. sexta* y *H. virescens*. Resultados posteriores en *B. mori* (Ihara *et al.*, 1993) también apoyaron la idea de que la unión irreversible de la toxina Cry1Aa se daba como

consecuencia de su oligomerización. También se ha relacionado la formación de los oligómeros con la toxicidad de las proteínas Cry (Gomez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004b).

### 1.7.5.2 Moléculas de anclaje de la toxina a membrana

#### 1.7.5.2.1 Aminopeptidasas N

Las aminopeptidasas pertenecen a la superfamilia de las metaloproteasas concretamente a la familia de las gluzincinas, caracterizadas por contener una secuencia característica en todas ellas (**Fig. 9**). Esta secuencia es un motivo catalítico caracterizado por presentar dos histidinas y un residuo de ácido glutámico, esto es HEXXH, pudiendo ser XX cualquier aminoácido. A este motivo le sigue, a unos 24 aminoácidos río abajo, otro residuo de glutámico (Rawlings y Barrett, 1995). Al conjunto de este motivo catalítico se une un ion de zinc que es el que desencadena la actividad catalítica del enzima mediante la activación de una molécula de agua (Vallee y Auld, 1995). Estudios han demostrado que existe otro ion de zinc y uno de calcio en la misma secuencia pero que no parecen estar envueltos en el proceso de activación del enzima (Massova *et al.*, 1998). Además del motivo antes descrito existe otro altamente conservado entre las aminopeptidasas que parece que también forma parte del sitio activo de la proteína, es el llamado GAMEN (**Fig. 9**) (Laustsen *et al.*, 2001). Existen otras regiones comunes en las aminopeptidasas de los insectos, como el péptido señal de corte en la región N-terminal, necesario para la reubicación de la proteína desde el interior celular a la superficie de la membrana plasmática. A ella se ancla mediante un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI), grupo que se une a la APN mediante una región también común a todas ellas (**Fig. 9**) (Garczyński y Adang, 1995).



**FIGURA 9. Representación esquemática de una APN típica en lepidópteros.** La proregion, así como la región rica en Thr ha sido publicada únicamente en algunas aminopeptidasas. Ésta última región parece que está O-glicosilada y forma como un rígido tallo que eleva el sitio activo por encima de la membrana plasmática. Fte.: Piggot y Ellar (2007).

El papel que juegan en el intestino de los insectos, junto con endopeptidasas y carboxipeptidasas, es el de la digestión de las proteínas ingeridas. De esta forma las endopeptidasas degradan las proteínas en pequeños péptidos, para que las aminopeptidasas y las carboxipeptidasas las degraden hasta aminoácidos desde el extremo amino- y carboxi-terminal, respectivamente (Terra y Ferreira, 1994). Además de jugar un importante papel en la digestión de las proteínas, se ha visto que también desempeñan la función de servir como moléculas de anclaje o de receptores de las toxinas Cry.

Actualmente, han sido caracterizadas numerosas aminopeptidasas en 15 especies diferentes de lepidópteros y, en muchos casos, más de una por especie (Crava *et al.*, 2010). Se han clasificado en cinco clases en función de su estructura y propiedades de unión de las toxinas Cry (Herrero *et al.*, 2005). La clase 1 se caracteriza por contener aminopeptidasas capaces de unir a la toxina Cry1Ac, la clase 2 a Cry1Aa y Cry1Ab, y la clase 3 (la que más aminopeptidasas presenta) a Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba y Cry1Fa. La clase 4 se caracteriza por no presentar el residuo de unión de azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) común en el resto de aminopeptidasas. Y por último, la clase 5 presenta el sitio activo GAMEN alterado, en donde las

metioninas se sustituyen por treoninas (Pigott y Ellar, 2007). Sin embargo, ante el descubrimiento de nuevas aminopeptidasas se han llegado a agrupar en ocho clases (Crava *et al.*, 2010).

La primera aminopeptidasa descrita en lepidópteros como receptor candidato a Cry1Ac, y de la que más estudios se han hecho, es la 120kDa-APN del lepidóptero *M. sexta*. Esta proteína fue purificada mediante cromatografía de intercambio iónico y de afinidad, además de ser clonado el gen que la codifica (Knight *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1995). Mediante la técnica de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) Masson *et al.* (1995) comprobaron que esta APN también tenía la capacidad de actuar como receptor a las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, sin embargo, su unión se realizaría en sitios diferentes al descubrirse que únicamente la toxina Cry1Ac se unía a través del azúcar GalNAc, residuo covalentemente ligado a la 120kDa-APN y que actuaría como epitopo (Knowles *et al.*, 1991; Masson *et al.*, 1995). Posteriormente, se descubrió que el dominio III de la Cry1Ac era el que estaba involucrado en la unión a este aminoazúcar (Burton *et al.*, 1999; de Maagd *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2000), aunque trabajos recientes también han involucrado al dominio II en esta unión (Pacheco *et al.*, 2009). Otros trabajos han mostrado con más profundidad la composición glucídica de la 120kDa-APN indicando que los residuos de GalNAc, involucrados en la unión de la toxina, se encuentran en el extremo C-terminal (Knight *et al.*, 2004). Además de la presencia de residuos aminoazucarados parece que también existen lípidos de carácter neutro asociadas a esta APN (Sangadala *et al.*, 2001). En este mismo lepidóptero también se han descrito otras APN pero como receptores de las toxinas Cry1C y Cry1Ab (Denolf *et al.*, 1997).

En otras especies de lepidópteros las aminopeptidasas también han sido propuestas como receptores de las toxinas Cry1A (**Tabla 2**).



**TABLA 2. Otras APN propuestas como receptores de las toxinas Cry1A en diferentes especies de lepidópteros.**

Lepidóptero	APN	Toxinas Cry con unión	Autores
<i>Bombyx mori</i>	120kDa-APN	Cry1Aa Cry1Ab	(Yaoi <i>et al.</i> , 1997)
	90kDa-APN2	Cry1Aa Cry1Ab	(Hua <i>et al.</i> , 1998a)
	110kDa-APN3	Cry1Aa Cry1Ab	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2002)
	100kDa-APN4	Cry1Aa Cry1Ab	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2002)
	APN96	Cry1Ac	(Shitomi <i>et al.</i> , 2006)
<i>Epiphyas postvittana</i>	120 kDa APN	Cry1Ac Cry1Ba	(Simpson y Newcomb, 2000)
<i>Helicoverpa armigera</i>	HaAPN1	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac	(Rajagopal <i>et al.</i> , 2003)
	HaAPN2	Cry1Ac	(Rajagopal <i>et al.</i> , 2003)
<i>Heliothis virescens</i>	BTBP1	Cry1Ac	(Gill <i>et al.</i> , 1995)
	170 kDa-Receptor A	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac	(Luo <i>et al.</i> , 1996)
	110kDa-APN	Cry1Fa	(Banks <i>et al.</i> , 2001)
<i>Lymantria dispar</i>	APN1	Cry1Ac	(Garner <i>et al.</i> , 1999; Valaitis <i>et al.</i> , 1995)
	λAPN2	Cry1Ac	(Garner <i>et al.</i> , 1999; Valaitis <i>et al.</i> , 1995)
	BTR-270	Cry1Aa Cry1Ab	(Valaitis <i>et al.</i> , 2001)

(Continúa en la página siguiente)

<i>Plutella xylostella</i>	120kDa-APN	Cry1Aa Cry1Ab	(Luo <i>et al.</i> , 1997) (Nakanishi <i>et al.</i> , 2002)
	APN1	Cry1Aa Cry1Ab	(Denolf <i>et al.</i> , 1997) (Nakanishi <i>et al.</i> , 2002)
	APNA	Cry1Aa Cry1Ab	(Chang <i>et al.</i> , 1999) (Nakanishi <i>et al.</i> , 2002)
	APN3	Cry1Aa Cry1Ab	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2002)
<i>Trichoplusia ni</i>	APN1	Cry1Ac	(Tiewisiri y Wang, 2011)

De todas estas aminopeptidasas descritas, algunas no han resultado ser determinantes para la unión de las toxinas Cry. Por ejemplo, Luo *et al.* (1997) no encontró relación alguna entre el fenotipo resistente a Cry1Ac de una cepa de *P. xylostella* con la unión a la 120kDa-APN; además, no se ha encontrado ligamiento genético entre la APN5 y la resistencia a Cry1Ac (Baxter *et al.*, 2008); o la ausencia de unión de Cry1Ac a PxAPN2 y PxAPN5 también descartaron su implicación (Chang *et al.*, 2012). Jenkins *et al.* (1999) a través de sus trabajos con *M. sexta* concluyeron que no existía relación directa entre la toxicidad de Cry1Ac con la unión a la 120kDa-APN. Así también, Simpson y Newcomb (2000) no encontraron indicio alguno de unión específica a la 120kDa-APN de *E. postvittana* expresada en un sistema heterólogo basado en células Sf9 (línea celular derivada de tejido ovárico del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* en estadio de pupa) con las toxinas Cry1Ac y Cry1Ba. En el caso de la 110kDa-APN de *H. virescens* aunque observaron unión de la toxina Cry1Fa en células S2 (células Schneider S2 de *Drosophila melanogaster*) no se detectó citotoxicidad (Banks *et al.*, 2001). El mismo caso se encontró en *O. nubilalis* donde células Sf21, transformadas con diferentes isoformas de OnAPN, no mostraron indicios de citotoxicidad a pesar de unir las toxinas Cry1Ab y/o cry1Fa (Crava *et al.*, 2010).

Hasta el momento cuatro trabajos han demostrado la relación directa de las aminopeptidasas con el modo de acción de las toxinas Cry. El primer de ellos

fue el llevado a cabo por Zhu *et al.* (2000), donde se demostró cierta asociación genética entre diferentes secuencias del gen codificante para la APN con el fenotipo resistente de una cepa de *Plodia interpunctella*. Posteriormente, los trabajos de Gill y Ellar (2002) y de Rajagopal *et al.* (2002) demostraron tal asociación mediante el uso de sistemas *in vivo*. En el primero se consiguió transformar larvas de *Drosophila melanogaster* con el gen *120kda-apn*, lo que le confirió un fenotipo susceptible frente a la toxina Cry1Ac, partiendo de que este díptero es resistente de forma natural a esta toxina. En el segundo, se disminuyó la expresión del gen que codificaba para la APN de *Spodoptera litura* mediante RNAi, lo que reducía la susceptibilidad de las larvas frente a la toxina Cry1C. Finalmente en *T. ni* la APN1 quedaba involucrada en la resistencia a Cry1Ac al estar su expresión reducida a nivel transcripcional y no por una mutación (Tiewisiri y Wang, 2011).

#### **1.7.5.2.2 Caderinas**

Las caderinas están representadas por una gran familia de glicoproteínas que están presentes tanto en vertebrados como en invertebrados, y que son esenciales para procesos celulares de vital importancia, tales como el reconocimiento entre células, señalización celular, comunicación celular, morfogénesis, angiogénesis, mantenimiento de la integridad celular, además de estar presentes en el sistema nervioso participando en la neurotransmisión (Angst *et al.*, 2001; Wheelock y Johnson, 2003).

En general, las caderinas se caracterizan por presentar un pequeño dominio intracelular, una región transmembrana y un dominio extracelular compuesto por una serie de repeticiones llamadas *cadherin repeats* (CR) (Fig. 10). Las caderinas comúnmente conocidas, o clásicas, tienen una función de adhesión entre células mediado por iones de calcio –de ahí su nombre- a través de los dominios extracelulares. Sin embargo, existen otras muchas pertenecientes a otras categorías en función de su morfología y de la función que desempeñan

como por ejemplo: las desmosomales, las caderinas flamingo, la familia FAT, las caderinas T y las protocaderinas (Angst *et al.*, 2001).

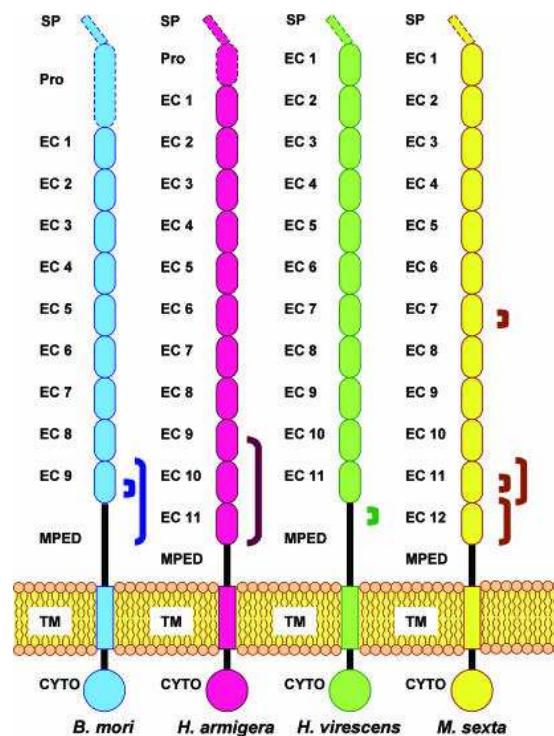
Hasta la fecha pocas proteínas tipo caderina (*cadherin-like protein*) han sido identificadas en lepidópteros, y sólo se han aislado de las membranas del ribete en cepillo de las células del intestino medio. Esto es debido a que se han considerado como receptores de las toxinas Cry desde que en 1993 se aisló, del lepidóptero *M. sexta*, una proteína tipo caderina con una elevada afinidad por la toxina Cry1Ab (Vadlamudi *et al.*, 1993). Desde entonces hasta ahora, son muchos los esfuerzos que han sido dirigidos hacia la búsqueda de este tipo de proteínas en otras especies de lepidópteros. De hecho, trabajos como los de Gahan *et al.* (2001) con el lepidóptero *H. virescens*, Morin *et al.* (2003) con *Pectinophora gossypiella* y Xu *et al.* (2005) con *Helicoverpa armigera*, han servido para realzar la importancia de papel que representan en la unión a las toxinas Cry, al encontrar asociación entre la resistencia a la toxina Cry1Ac y el gen que las codifica.

Posteriormente, y tras cartografiar el gen *BtR-4* codificante para la caderina HevCaLP del lepidóptero *H. virescens*, se observó que en la cepa YHD2, resistente a la toxina Cry1Ac, presentaba un alelo de este gen caracterizado por la inserción de un elemento transponible que introducía un codon de parada, por lo que se postuló que fuera esta mutación la causa del fenotipo resistente (Gahan *et al.*, 2001). Sin embargo, parece ser que esta caderina no cobraba un total protagonismo como receptor de las toxinas Cry, puesto que estudios mediante células humanas transformadas con HevCaLP, no resultaron afectadas al entrar en contacto con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac (Aimanova *et al.*, 2006). También se ha visto el mismo caso con la caderina de *H. armigera* HaBtR, pues la cepa resistente también contiene la inserción de un elemento transponible que trunca la proteína confiriendo resistencia a la toxina Cry1Ac (Yang *et al.*, 2007). De hecho, la introgresión de este alelo en la cepa susceptible permitió convertirla en una cepa resistente a la toxina Cry1Ac (Yang *et al.*, 2009). A pesar de la aparición de esta resistencia, la tasa de

supervivencia no era tan elevada con una dieta con Cry1Ac (Yang *et al.*, 2007) o con algodón transgénico Bt (Yang *et al.*, 2009), por lo que el grupo de Zhao *et al.* (2010) presentó otros alelos que podrían estar interviniendo en el fenotipo resistente.

Este tipo de proteínas también han sido identificadas en *M. sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1993) como Bt-R<sub>1</sub>, siendo ésta una glicoproteína de membrana de 210 kDa que une a la toxina Cry1Ab, tóxica para este insecto. Muchos trabajos se han llevado a cabo con esta proteína, tales como expresarla en sistemas heterólogos como las células Sf21 (línea celular obtenida a partir de tejido ovárico de pupas del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*). Estas células transformadas con el gen *Bt-R<sub>1</sub>*, eran capaces de unir las proteínas Cry tóxicas para *M. sexta*, como Cry1Aa y Cry1Ac. Las toxinas Cry3Aa y Cry11Aa que no mostraban toxicidad no mostraron unión (Keeton y Bulla, 1997). De esta caderina también se ha estudiado mucho su estructura (**Fig. 10**). Consta de un dominio extracelular que contiene un péptido señal, 12 CR y un dominio próximo a la membrana. Además, presenta una región transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático (**Fig. 10**) (Dorsch *et al.*, 2002; Vadlamudi *et al.*, 1995). Esta estructura es común dentro de las caderinas relacionadas con Bt en el orden de los lepidópteros (**Fig. 10**), pero difiere del resto de caderinas conocidas (Bel y Escriche, 2006). Dos grupos estudiaron el sitio de unión de Bt-R<sub>1</sub> a Cry1Ab, el grupo de Gómez *et al.*, (2002) lo identificó en el CR7, el grupo de Dorsch *et al.* (2002) lo identificó en CR11 y Hua *et al.* (2004) en el CR12 (**Fig. 10**). De hecho, en el trabajo del primer grupo (Gomez *et al.*, 2002) se sintetizaron anticuerpos cuyo sitio de reconocimiento mimetizaba la zona de unión a proteínas de la caderina, lo que facilitó la formación de oligómeros de Cry1Ab, necesarios para la formación de poros en este insecto. En el tercer trabajo (Hua *et al.*, 2004) identificaron el CR12 como determinante en la unión de la toxina Cry1Ab tras observar citotoxicidad en las células S2 de *D. melanogaster* transformadas con el dominio CR12. A pesar de estas discordancias, lo que sí parece evidente es que la caderina Bt-R<sub>1</sub> es clave para la toxicidad de Cry1Ab en *M. sexta*.

Otra caderina identificada pero en este caso, como receptor de la toxina Cry1Aa, fue la del lepidóptero *B. mori* o gusano de seda (Nagamatsu *et al.*, 1999). Se la denomina BtR175, y se trata de una glicoproteína de 175kDa. BtR175 también fue expresada en células Sf9 las cuales mostraron susceptibilidad frente a Cry1Aa (Nagamatsu *et al.*, 1999). Esta susceptibilidad también se observó tras entrar en contacto con las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac en sistemas *ex vivo*, basados en células aisladas del intestino medio de *B. mori* (Hara *et al.*, 2003). En esta caderina también se determinó como dominio de unión a la Cry1Aa el CR9 junto con 112 aminoácidos de la región próxima a membrana (Fig. 10) (Nagamatsu *et al.*, 1999).



**FIGURA 10. Dominios estructurales y puntos de unión (segmentos verticales) de las toxinas Cry1A en diferentes caderinas de lepidópteros.** PRO: región propeptídica, SP: péptido señal, EC: ectodominio (o *cadherin repeats*), MPED: dominio extracelular proximal, TM: dominio transmembrana, CYTO: dominio citoplasmático. Las proteínas se dibujan de tal manera que las regiones homólogas se alinean horizontalmente. Fte.: Pigott y Ellar (2007)

Hasta el momento, sólo se ha hecho referencia a las caderinas como receptores de las toxinas Cry en lepidópteros. Sin embargo, también han sido identificadas como receptores funcionales en coleópteros como *Tenebrio molitor* (Fabrick *et al.*, 2009), *Diabrotica virgifera* (Sayed *et al.*, 2007), *Tribolium castaneum* (Contreras *et al.*, 2013) o *Alphitobius diaperinus* (Hua *et al.*, 2014); y en dípteros como el mosquito *Aedes aegypti* (Chen *et al.*, 2009) o *Anopheles gambiae* (Hua *et al.*, 2013).

La aplicación en la práctica de todos estos descubrimientos se hizo patente en el trabajo de Chen *et al.* (2007) con la caderina Bt-R1 de *M. sexta*. En este trabajo mostraron como, curiosamente, la zona de unión a la toxina Cry1Ab, el segmento CR12, actuaba sinérgicamente potenciando su toxicidad al contrario de lo que cabría pensar. Una de las hipótesis que se barajaba (Pacheco *et al.*, 2009) era que, de alguna forma, este segmento proteico ayudaba a la oligomerización de la toxina para actuar mejor según el modelo de Bravo *et al.* (2004) el cual se verá posteriormente. Este mismo sinergismo también se encontró con la región CR11 de la caderina de *Anopheles gambiae* con la toxina Cry4Ba (Hua *et al.*, 2008), la de *A. gambiae* frente *Aedes aegypti* con la Cry4Ba (Park *et al.*, 2009b), la región CR8-CR10 de la caderina del coleóptero *Diabrotica virgifera* con la toxina Cry3A y Cry3B y frente a *Diabrotica undecimpunctata* y *Leptinotarsa decemlineata* (Park *et al.*, 2009a), y finalmente, la de *H. armigera* con la toxina Cry1Ac (Peng *et al.*, 2010b). De este último autor existe otro trabajo en el mismo año (Peng *et al.*, 2010a) en el que transformaba una cepa de *B. thuringiensis* acristalífera con los genes codificantes para la región de unión de la caderina de *H. armigera* y de la toxina Cry1Ac, consiguiendo así una mejora de la toxicidad frente a *H. armigera* y *Spodoptera exigua*. Este descubrimiento abrió una nueva puerta para mejorar el potencial de toxicidad tanto de las cepas de *B. thuringiensis* como el de las plantas transgénicas con *B. thuringiensis*.

Decir que otros estudios han demostrado la ausencia de ligamiento genético entre la de *P. xylostella* PxCaLP y la resistencia a Cry1Ac (Baxter *et al.*, 2005),

lo que deja la puerta abierta a pensar que las caderinas puede que no estén implicadas en todas las especies lepidópteros susceptibles a las toxinas Cry.

### 1.7.5.5.3 Otros receptores

La utilización de *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental permitió encontrar que la mutación de uno o varios genes codificantes para glicosiltransferasas de una misma ruta de glicosilación, provocaba la resistencia de este nematodo a las toxinas Cry5A y Cry14A, tóxicas para nematodos e insectos. Estas glicosiltransferasas se encargan de catalizar la adición de monosacáridos a residuos glicolípidos específicos de invertebrados, y en este caso, parece que los glicoconjugados que se forman actúan como moléculas de unión frente a estas toxinas (Griffitts *et al.*, 2005).

Otra proteína identificada como posible receptor de las toxinas Cry es la fosfatasa alcalina (FAL) o ALP (del inglés *alkaline phosphatase*). Esta molécula es una glicoproteína que se ancla en la membrana a través de una molécula GPI como las aminopeptidasas, pero su función es la defosforilación de proteínas, nucleótidos y otras moléculas (Coleman, 1992). Como receptor de las toxinas Cry se ha demostrado que actúa como tal para la toxina Cry1Ac en *M. sexta* (McNall y Adang, 2003; Sangadala *et al.*, 1994) y *H. virescens* (Jurat-Fuentes y Adang, 2006); para la toxina Cry11Aa en el mosquito *A. aegypti* (Fernandez *et al.*, 2009) y para la toxina Cry11Ba en *A. gambiae* (Hua *et al.*, 2009), y para Cry1B en el coleóptero, plaga del algodón, *Anthonomus grandis* (Martins *et al.*, 2010). Se ha visto que niveles reducidos de esta proteína se corresponde con elevados niveles de resistencia frente la toxina Cry1Ac en la cepa resistente YHD2 de *H. virescens* (Jurat-Fuentes y Adang, 2004).

Otras moléculas candidatas relacionadas con la unión de las toxinas Cry fueron las isoenzimas MPI al demostrar ligamiento con la resistencia a las toxinas Cry1A en dos poblaciones de *H. virescens* y de *P. xylostella* (Heckel *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 2001a). Otro candidato fue el glicoconjugado llamado



BTR-270 aislado del lepidóptero *L. dispar* que presentó una alta afinidad por las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ba (Valaitis *et al.*, 2001). Finalmente, la glicoproteína P252 aislada de *B. mori* y con alta especificidad por las Cry1A, fue caracterizada también como un posible receptor (Pandian *et al.*, 2008).

#### **1.7.5.5.4 Composición de la membrana lipídica**

La composición de la membrana lipídica puede influenciar en la inserción de las toxinas. Así, se ha descubierto que la membrana celular es algo más que una bicapa lipídica compuesta por lípidos y proteínas, también contiene zonas ricas en esfingomielina, colesterol y fosfoesfingolípidos, que constituyen los llamados *lipid rafts* o balsas lipídicas involucrados en procesos celulares como los de señalización. En estos microdominios se localizan muchas de las proteínas ancladas a membrana mediante la molécula GPI, como son las aminopeptidasas o la ALP, que tal y como se ha comentado, se las considera como posibles receptores de las Cry1A (Zhuang *et al.*, 2002).

### **1.7.6 Muerte celular**

Dentro del modo de acción de las toxinas Cry se distinguen actualmente, dos modelos que difieren entre sí en la finalización de todo el proceso tóxico que se lleva tras la unión de las toxinas a la célula. Los dos modelos que existen son el modelo de formación de poro y el modelo de transducción de la señal.

#### **1.7.6.1 Modelo de formación de poro**

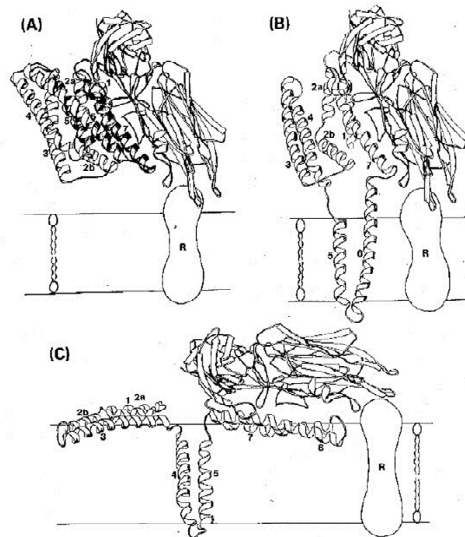
Una vez la toxina reconoce su receptor y se une a él, se desarrollan una serie de cambios conformacionales que hacen que el dominio I interactúe y se una a la membrana apical, con el fin de formar el poro iónico. Así pues, es el dominio I el que presenta la función de abrir paso a toda una corriente de

moléculas de agua e iones hacia el interior de la célula, debido a su naturaleza hipertónica. Con ello se desestabiliza el equilibrio osmótico dando lugar a un colapso osmótico en la célula provocando su lisis (Knowles y Ellar, 1987).

Este papel que desempeña el dominio I ha sido confirmado gracias a trabajos como los llevados a cabo mediante mutaciones en este dominio en las toxinas Cry1A. En estos trabajos las toxinas fueron incapaces de insertarse en la membrana puesto que las mutaciones implicaban una introducción de cargas negativas (Chen *et al.*, 1995; Wu y Aronson, 1992) o la eliminación de cargas positivas (Hussain *et al.*, 1996) en la cara inferior del dominio I que se expone hacia la membrana, evitando así la interacción de la toxina con la membrana la cual tiene carga negativa. La unión reversible de estos mutantes no quedaba afectada, pero sí se reducía considerablemente la unión irreversible, lo que apoyaría aún más la inserción del dominio I en la membrana para la inmediata formación del poro.

En el apartado 1.6 se ha comentado que el dominio I está constituido por siete hélices  $\alpha$  antiparalelas y anfipáticas. Seis de éstas forman un ramillete que rodea a la hélice  $\alpha 5$ . Algunas de estas hélices  $\alpha$  son las que se alojan en el interior de la membrana para formar el poro, mientras que el resto quedan en la cara externa. Para que esta inserción ocurra, se propone que las toxinas Cry han de sufrir un gran cambio conformacional debido a su naturaleza hidrosoluble. De hecho, se han formulado dos modelos (**Fig. 11**) en los que se propone el modo de inserción de la toxina a la membrana tomando como ejemplo el modo de acción de otras toxinas bacterianas también formadoras de poro, como son la colicina A, exotoxina A de *Pseudomonas* y la toxina diftérica (Li, 1992; Parker y Pattus, 1993). El primer de los dos modelos es el llamado “modelo de la navaja”, en él se propone que las hélices  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  se insertan en la membrana sin mediar el resto de dominios (**Fig. 11**) (Knowles, 1994). El segundo modelo, llamado “modelo del paraguas”, se propone que las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  son las que se insertan en la membrana, mientras que el resto de hélices se acomodan sobre la membrana exponiendo hacia ella su cara

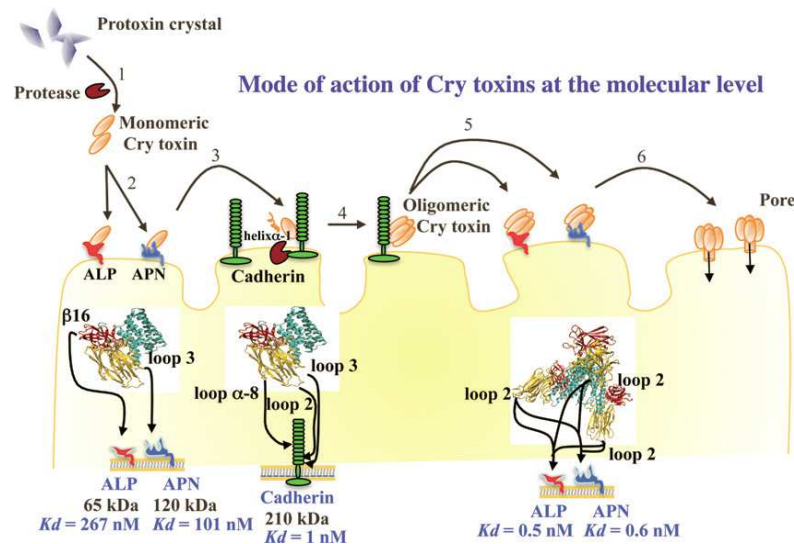
hidrofóbica, de esta forma la molécula quedaría anclada en la membrana tomando la forma de un paraguas (Fig. 11) (Li *et al.*, 1991). Existen más evidencias a favor del último modelo con trabajos como los de Schwartz *et al.* (1997), Masson *et al.* (1999) y Zavala (2011). En el primero se inmovilizó la hélice  $\alpha 5$  de la toxina Cry1Aa con puentes disulfuro mediante la introducción de residuos de Cys. Con esta mutación la toxina dejaba de ser tóxica y sólo con un ambiente reductor y por tanto, destructor de estos puentes, la proteína era capaz de recuperar su actividad tóxica manifestando así, la importancia de la flexibilidad de esta hélice. Con el estudio de Masson *et al.* (1999) se confirmó el papel que desempeñaba la hélice  $\alpha 4$  al comprobar que formaba parte del lumen del poro que se forma. De la misma forma, el trabajo de Zavala *et al.* (2011) comprobaba la implicación de estas dos  $\alpha$  hélices en la formación del poro.



**FIGURA 11. Modelos de inserción en membrana propuestos para las toxinas Cry.**

Tras la unión de la toxina Cry a sus receptores de membrana (A), en el modelo de navaja (B) se produce la inserción de las hélices  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  en la membrana quedando el resto de hélices en el exterior formando parte de la estructura proteica. En el modelo en paraguas (C), las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  atraviesan la membrana como una horquilla y las otras hélices quedan extendidas en la superficie de la membrana. Fte.: Knowles (1994)

Al principio se pensaba que la toxina se insertaba en forma de monómero, pero tras sucesivos experimentos se ha comprobado que las proteínas Cry sufren una oligomerización entre ellas mediada por el receptor, y que es ésta la estructura que se insertaría en la membrana a través del dominio I de los monómeros que la forman (Aronson *et al.*, 1999). Tras diferentes modelos presentados por el grupo de Bravo y Soberón, finalmente el que se ha propuesto es el modelo de acción que lleva a cabo la toxina Cry1Ab en larvas de *M. sexta* (Pardo-Lopez *et al.*, 2013) (**Fig. 12**). En este modelo se propone que, en primer lugar, la toxina Cry1Ab se uniría débilmente al residuo de GPI anclado en los receptores ALP o APN. Esta unión facilitaría la concentración de las toxinas Cry1Ab en la superficie de las membranas de las células epiteliales del intestino medio. Tras este paso, la toxina Cry1Ab se uniría con mayor afinidad a la caderina, lo que facilitaría un procesado proteolítico de Cry1Ab eliminando la hélice  $\alpha 1$  del dominio I y, a su vez, se induciría la formación de oligómeros que ganarían afinidad tanto por el receptor ALP como por el de APN (Pardo-Lopez *et al.*, 2013). Tras esta última unión se facilitaría la inserción del oligómero de toxinas Cry1Ab a membrana y la formación de poros (Bravo *et al.*, 2011) con la consecuente muerte celular por choque osmótico (**Fig. 12**) (Knowles y Dow, 1993). En esta línea este grupo de investigación propone que tal secuencia de reacciones se establece a través de un modelo de tipo “ping-pong” (Pacheco *et al.*, 2009). Se ha establecido que las primeras uniones serían de carácter reversible y la última irreversible (Ihara y Himeno, 2008).

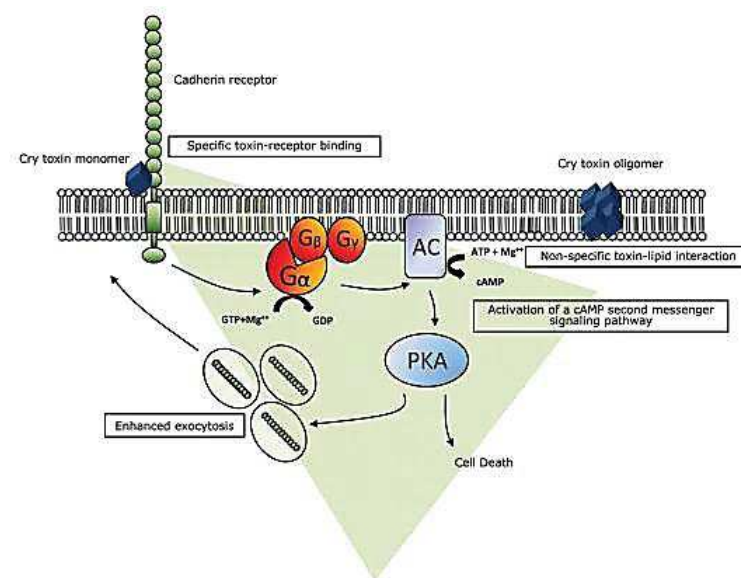


**FIGURA 12. Mecanismo de acción de las toxinas Cry a nivel molecular propuesto por Pardo-López *et al.* (2012).** Paso 1. Las larvas ingerirían la protoxinas Cry, las cuales en el medio alcalino y condiciones reductoras del intestino medio se solubilizarían y posteriormente se activarían por proteasas. Paso 2. La toxina Cry activada se uniría, con una baja afinidad, a los receptores ALP y APN, situados en membrana, consiguiendo de forma acercarse a la membrana celular. Paso 3. La toxina Cry, en forma aún monomérica, se uniría con alta afinidad al receptor caderina induciendo, tras esta interacción, el corte de la región N<sub>t</sub> de la toxina incluyendo la hélice  $\alpha$ 1 del dominio I. Paso 4. Gracias a este procesamiento la toxina Cry podría oligomerizarse formando un agregado oligomérico pre-poro. Paso 5. Este oligómero se uniría con elevada afinidad a los receptores ALP y APN. Paso 6. Esta unión permitiría al oligómero insertarse en la membrana para poder formar el poro definitivo. Fte.: Pardo-López *et al.*, (2012).

### 1.7.6.2 Modelo de transducción de la señal

Este modelo fue propuesto por Zhang *et al.* (2005) mediante ensayos con líneas celulares que expresaban la caderina Bt-R1 de *M. sexta*. Este grupo argumentaba que no estaba totalmente demostrada la correlación entre la formación del poro y la citotoxicidad. Por ello, presentaron un modo de acción alternativo de las toxinas Cry en el que la toxina Cry1Ab, en forma monomérica, se uniría a la caderina Bt-R1 desencadenando una cascada de señales dependiente de  $Mg^{+2}$ , que estimularía la proteína G y la adenilato ciclasa

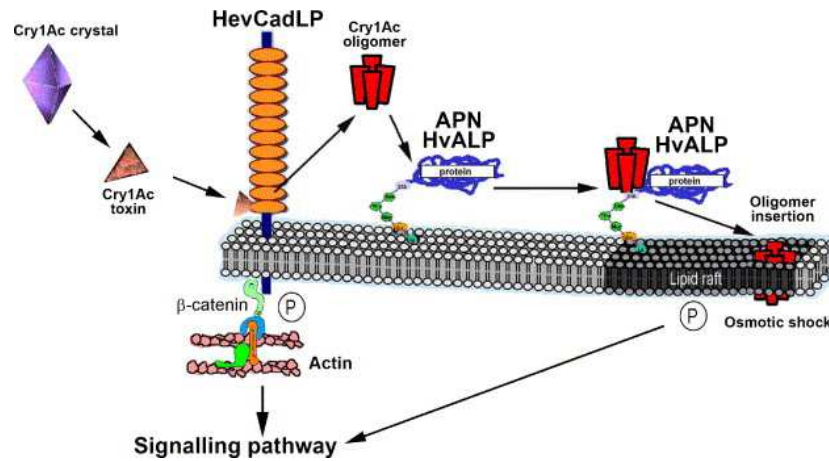
provocando un aumento del AMPc (Fig. 13). El incremento de estos componentes celulares activaría una proteína kinasa A, que desestabilizaría el citoesqueleto y los canales iónicos, provocando la muerte de la célula (Zhang *et al.*, 2006). Además, este mecanismo promovería la translocación de la caderina por exocitosis, desde vesículas de membrana intracelulares a la membrana apical de las células, para amplificar la señalización lo que llevaría el insecto a la muerte (Fig. 13) (Zhang *et al.*, 2008). Según este modelo, la formación de poro sería el resultado y no la causa del proceso tóxico puesto que los oligómeros de proteínas Cry insertados en membrana, no formarían poros ni serían tóxicos para la célula (Ibrahim *et al.*, 2010).



**FIGURA 13. Modelo propuesto de transducción de la señal.** Este modelo se llevaría a cabo mediante una cascada de señales a partir de la unión de la toxina Cry a la caderina. Esta unión estimularía las proteínas G y la adenilato ciclasa (AC) la cual promovería la síntesis intracelular de AMPc que actuaría como mensajero secundario con el que la proteína-quinasa A (PKA) conseguiría desestabilizar el citoesqueleto y los canales iónicos llevando a la célula a la muerte. Toda esta cascada de señales provocaría, a la vez, un aumento de moléculas de caderina en la membrana celular por exocitosis, por lo que la señal se amplificaría. En este modelo se considera que los oligómeros se incorporarían a la membrana pero no provocarían ni poros ni serían tóxicos para la célula. Fte.: Ibrahim *et al.*, (2010).

### 1.7.6.3 Modelo de síntesis

Denominamos de esta forma a este modelo debido a que combina los pasos de los dos modelos vistos anteriormente. En este modelo se explica el modo de acción de la toxina Cry1Ac en *H. virescens* (Jurat-Fuentes y Adang, 2006). Se sugiere que la citotoxicidad viene dada por la acción combinada entre la lisis osmótica y los procesos de señalización celular, ambos conceptos tomados del modelo de Bravo y del de Zhang. El proceso sería el siguiente (**Fig. 14**), en primer lugar un monómero de toxina Cry1Ac activa se uniría a la caderina HevCaLP, esta unión conllevaría la activación de una ruta de señalización intracelular mediada por fosfatasas que induciría la muerte celular junto con una interacción entre la toxina y la actina, una proteína del citoesqueleto que interactúa con el dominio citosólico de las caderinas. Después de la unión con la caderina, los monómeros de Cry1Ac se oligomerizarían uniéndose a la APN y a la HvALP (fosfatasa alcalina de *H. virescens*), lo que llevaría a la célula a un *shock* osmótico, así como a la activación de una ruta de apoptosis celular (**Fig. 14**). A pesar del interés que ha suscitado este nuevo modelo, existen aún partes que quedan experimentalmente por demostrar, de hecho, actualmente se considera que previa a la unión de Cry1Ac a la caderina habría una unión a la APN o ALP que facilitarían la concentración de toxinas Cry1Ac (Bravo *et al.*, 2011).

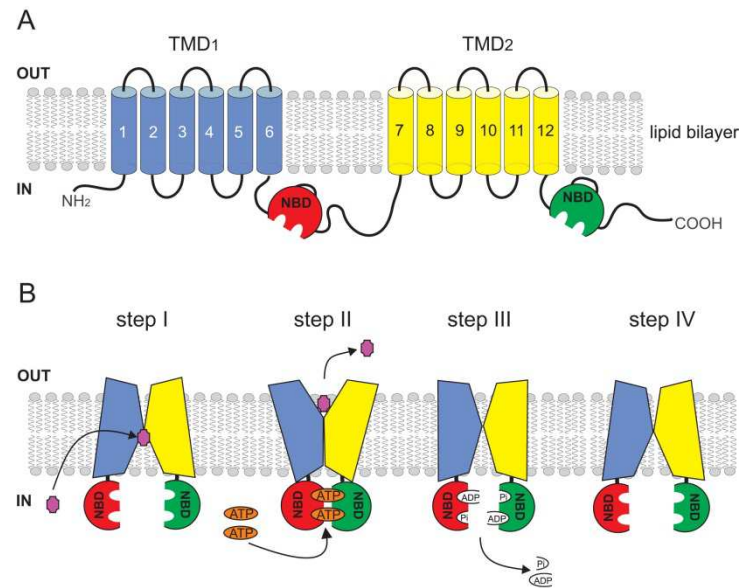


**FIGURA 14. Modelo de acción propuesto a través de la fosfatasa alcalina (ALP).** Este modelo de acción fue propuesto para la toxina Cry1Ac en larvas de *Heliothis virescens*. En este modelo las toxinas Cry1Ac activadas se unirían a la caderina de *H. virescens* HevCadLP. Esta unión llevaría a cabo la activación intracelular de fosfatasa (P) que activarían respuestas apoptóticas en la célula. Por otra parte, podrían formarse oligómeros de Cry1Ac que se unirían a moléculas ancladas a través de un residuo de GPI (HvALP, APN) lo que permitiría la inserción del oligómero en la membrana formando un poro lo que llevaría a la muerte celular por un choque osmótico. Fte. Jurat-Fuentes *et al.*, (2006).

#### 1.7.6.4 Complejo proteico transportador ABC

La familia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporter*) son proteínas transmembrana que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para llevar a cabo, entre otros, determinados procesos biológicos que incluyen la translocación de una gran diversidad de sustratos a través de la membrana celular. Esta familia de transportadores es de las más grandes que hay y están presentes en todos los reinos (Davidson *et al.*, 2008; Goffeau, 2004). A pesar de que están muy bien estudiados en vertebrados (Fig. 15) en relación al papel que desempeñan en la resistencia frente a drogas, se conoce poco sobre el papel que puedan desempeñar en el transporte de sustratos en artrópodos, únicamente se han estudiado con un poco más de detalle en cinco especies de insectos, un crustáceo y un quelícero (Dermauw y Van Leeuwen, 2014).





**FIGURA 15. Estructura del transportador ABC y modelo de activación por ATP.** A. Estructura típica de un transportador ABC el cual contiene dos dominios transmembrana (TMD) los cuales contienen 6 segmentos transmembrana (TM). Presenta también dos dominios de unión a nucleótidos (NBD). B. El proceso de transporte de moléculas empezaría con la unión con alta afinidad del sustrato (cruz magenta) a transportar a una cavidad formada en el TMD. Posteriormente, un cambio conformacional se transmitiría a los NBDs facilitando la unión del ATP y la formación de un dímero de los NBDs (paso I). Este dímero formado induciría un cambio conformacional en los TMDs de forma que estos dominios rotarían y se abrirían hacia el exterior translocando el sustrato (paso II). La hidrólisis de la molécula de ATP permitiría la disolución de dímero NBD, que a su vez llevaría a un nuevo cambio conformacional en los TMDs (paso III). Finalmente, el grupo fosfato y el ADP restablecería la posición inicial de los NBDs (paso IV). Fte.: Dermauw y Van Leeuwen, (2014).

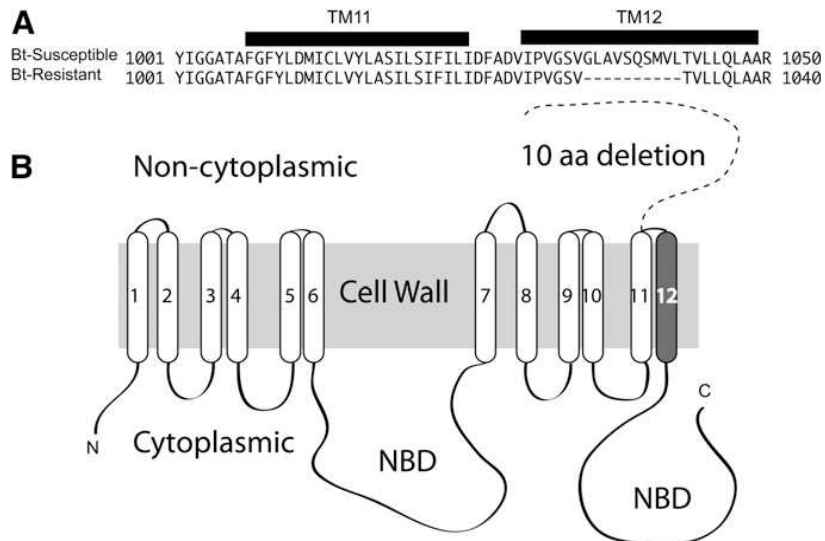
En relación con las toxinas Cry se han desarrollado diferentes trabajos en los que relacionan el transportador ABCC2 (ABC subfamilia C2) directamente con el desarrollo de resistencias frente las toxinas Cry. Así pues, un alelo mutante de este transportador está genéticamente ligado a la resistencia de una colonia de laboratorio resistente de *H. virescens* (Gahan *et al.*, 2010). Además, este grupo comprobó cómo una mutación en ABCC2 impedía la unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac a BBMV de este lepidóptero, así como que este complejo

proteico podría facilitar la oligomerización de las toxinas Cry antes de su unión a la membrana (Gahan *et al.*, 2010). En *B. mori* también se ha visto ligamiento genético entre la resistencia a Cry1Ab de determinadas cepas con el gen codificante para este transportador, el cual quedaría situado en el cromosoma 15 (Atsumi *et al.*, 2012). Trabajos con colonias resistentes de *P. xylostella* como de *T. ni* también han determinado la existencia de ligamiento genético entre la resistencia a Cry1Ac y las mutaciones en el transportador ABCC2 (**Fig. 16**) (Baxter *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2015b). Anteriormente en *P. xylostella* ya se había rechazado que la resistencia estuviera ligada a la caderina, APN y ALP, pues quedaban situadas en grupos de ligamiento distintos al que estaba situado el gen de la resistencia a Cry1Ac (Baxter *et al.*, 2005; Baxter *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2015a). En *T. ni* la APN1 quedaba involucrada en la resistencia a Cry1Ac al estar su expresión reducida a nivel transcripcional y no por una mutación (Tiewisiri y Wang, 2011). Posteriormente, en este mismo insecto se demostró la ausencia de ligamiento genético con la caderina (Zhang *et al.*, 2012).

Se ha comprobado que el transportador ABCC2 interacciona con las toxinas Cry, pues hasta el momento no se sabía si actuaba o no como receptor. Esta interacción se comprobó expresando ectópicamente el transportador BmABCC2 (de una cepa de *B. mori* susceptible a Cry1Ab) en células Sf9, convirtiéndolas en susceptibles a Cry1Ab y Cry1Ac. Además, la expresión conjunta de BmABCC2 y de la caderina BtR175 aumentaba el abanico de susceptibilidad a las toxinas Cry, llegando incluso a serlo frente a Cry8Ca, proteína filogenéticamente distante de las Cry1A. Por ello, se ha sugerido que el transportador ABC, así como las caderinas, estarían jugando un papel crucial en el modo de acción de las toxinas Cry (Tanaka *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha visto en una cepa resistente de *S. exigua* que una mutación en este complejo proteico (en este caso, traducido en una delección en la zona intracelular de unión al ATP) sería la causa de su resistencia al producto comercial Bt Xentari<sup>®</sup> formulado mayoritariamente con Cry1Ca (Park

*et al.*, 2014). También se ha publicado que la resistencia a Cry1Ac en una cepa de *H. armigera* estaría ligada a la ausencia del fenómeno de *splicing* en el complejo ABCC2 de este insecto traducido también, como en el trabajo anterior, en una delección en el dominio intracelular de unión al ATP (Xiao *et al.*, 2014).



**FIGURA 16. Esquema del transportador ABCC2 en *P. xylostella*.** (A) Mediante el alineamiento entre las secuencias de aminoácidos del ABCC2 entre una cepa susceptible y resistente de *P. xylostella* se observa la delección de una región de 10 aminoácidos en la región del dominio transmembrana número 12. (B) Esta delección se representa esquemáticamente de forma que es la responsable de que se libere un extremo Ct al espacio extracelular (línea discontinua) dejando aislado el dominio transmembrana 12. Fte.: Baxter *et al.*, (2011).

## 2. PRODUCTOS COMERCIALES Y PLANTAS TRANSGÉNICAS Bt

### 2.1 Productos Bt

En 1938 apareció el primer producto comercial basado de *B. thuringiensis* llamado Sporeine disponible en Francia para el control del gusano barrenador de la harina (Aronson *et al.*, 1986). Los productos comerciales desarrollados a partir de entonces fueron mejorados para aumentar su eficacia en campo. Una de las mejoras fue el uso de la cepa HD1 del serovar *kurstaki* (expresa Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa y Cry2Ab), la cual era hasta 200 veces más activa frente plagas agrícolas de lepidópteros que los productos del momento (Dulmage, 1970), además ha demostrado ser efectiva contra 167 especies de lepidópteros (Glare y O'Callaghan, 2000). La cepa HD1 es la que más se utiliza en la mayoría de formulaciones para plagas de lepidópteros, de hecho, en los últimos 20 años el mercado de los bioinsecticidas ha sido dominado por productos que contienen como ingrediente activo una mezcla de esporas y cristales de esta cepa. Además, esta cepa suele utilizarse como referencia para cálculos de actividad relativa de otros productos de nueva generación.

El descubrimiento del serovar *israelensis* (expresa Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11A y Cyt1A) (Goldberg y Margalit, 1977), abrió nuevos mercados, pues se formularon productos comerciales para el control de nuevos órdenes de insectos plaga como mosquitos y mosca negra, incrementando en un 0.5% las ventas en el mercado de los insecticidas. El hallazgo de nuevas cepas Bt con otras especificidades (coleópteros, nematodos, ácaros, etc.) ha permitido el desarrollo de otros productos ampliando el campo de los bioinsecticidas.

La mayoría de bioinsecticidas Bt son producidos con cepas de Bt nativas, sin embargo, existen otros cuya composición de toxinas surgen de manipulaciones genéticas. De esta manera, se puede decir que existen tres tipos de productos Bt: los de primera, segunda y tercera generación.

Los de primera generación son aquellos cuya formulación incluye como ingrediente activo una mezcla de esporas y cristales de una cepa nativa de *B. thuringiensis*. Son los más numerosos representando alrededor de un 84% del total de productos registrados. Un ejemplo de estos productos lo tenemos con Dipel® (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cepa HD1; Abbott Laboratories), Thuricide® (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*; Thermo Trilog Corporation), activos frente lepidópteros, y Xentari® (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai*; Abbott Laboratories) activo frente a dípteros.

Los de segunda generación son una mezcla de esporas y cristales procedentes de una cepa de Bt a la cual se introdujo por conjugación o transformación, los genes *cry* de otras cepas nativas de Bt. Así se amplía el espectro de actividad hacia otros insectos plaga. Las cepas nativas de Bt huésped pueden mantener de forma estable y con una expresión eficiente. Además, muchas veces se usan genes *cry* codificantes para toxinas que sinergizan entre ellas, o que tengan diferentes modos de acción, lo que reduce considerablemente la posibilidad de desarrollo de resistencia. Ejemplos: Novodor® (Abbott Labs.) activo frente coleópteros, Condor® y Foil® (Ecogen Inc.) activos frente lepidópteros.

Finalmente, los productos de tercera generación han sido desarrollados para resolver las limitaciones de su corta toxicidad en campo debido a la rápida degradación de las toxinas Cry por los rayos UV del Sol y a que son fácilmente deslavados por la lluvia. Así pues, los productos de tercera generación son aquellos cuya formulación contiene bacterias recombinantes muertas de *Pseudomonas fluorescens* que han sido transformadas con genes *cry*. De esta forma las toxinas Cry quedan encapsuladas por la bacteria muerta, protegidas de los rayos UV; un ejemplo lo tenemos con el producto MVP® (Mycogen) basado en una formulación de protoxina Cry1Ac expresada y encapsulada por la bacteria transgénica *P. fluorescens*.

## 2.2 Plantas transgénicas Bt

Si comentábamos la facilidad de deslavado de los productos Bt en campo, así como su degradabilidad por los rayos UV del Sol, 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 en ciertas partes de la planta, como en un momento determinado en el ciclo, como su expresión de forma constitutiva durante todo el tiempo.

El primer informe de una planta transgénica con un gen *cry* de Bt data de 1987. En él se desarrollaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que producían cantidades suficientes de toxina Cry para controlar larvas de primer estadio de *M. sexta*.

En 1995 en Estados Unidos la EPA aprobó por primera vez la liberación en campo y la comercialización de tres cultivos Bt: algodón que expresaba la toxina Cry1Ac (Bollgard<sup>®</sup>, Monsanto), patata que expresaba la Cry3A (Newleaf<sup>®</sup>, Monsanto) y maíz que expresaba la toxina Cry1Ab (Maximizer<sup>®</sup>, Novartis). Cifras recientes muestran que los cultivos Bt, tanto de algodón como de maíz se han visto incrementados en EEUU. Este aspecto se ve claramente en el caso del maíz Bt. En 1997 el 8% del cultivo de maíz era Bt, siendo en 1999 del 26%. Disminuyó en 2000-2001 quedando en un 19%, pero ya en 2003 llegó a alcanzar un 29% y en 2013 un 76%. En el caso de los cultivos de algodón Bt, su expansión fue muy rápida pasando del 15% en 1997 al 37% en 2001, llegando a un máximo del 77% en 2012, quedando en un 75% en 2013 (<http://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crop-in-the-us/recent-trends-in-ge-adoption.aspx>).

En Europa únicamente se puede (como cultivo Bt) cultivar maíz transgénico Bt MON 810 el cual posee el gen *cry1Ab*, eficaz frente a los lepidópteros *Ostrinia nubilalis* y *Sesamia nonagroides* o taladros del maíz. De hecho, España aunque es el sexto en la lista de productores de maíz en Europa, es el primer

país europeo que encabeza la lista del porcentaje de maíz Bt cultivado en Europa, con un total de 116307 ha equivalente al 90% de cultivo de maíz de toda Europa (total 129071 hectáreas). Estos datos representarían un crecimiento del 19.5% respecto a 2011 y el 30% del total de cultivos del país. (ISAAA, 2012). Aragón es la comunidad autónoma con mayor superficie de maíz Bt con 41669.39 hectáreas, 301.39 más que en 2011, seguida de Cataluña y Extremadura con 33530.86 y 15951.53 hectáreas, respectivamente (datos Fundación Antama). Su destino es principalmente la fabricación de piensos ([http://www.asebio.com/es/nota\\_de\\_prensa.cfm?iid=21022013transgenicos](http://www.asebio.com/es/nota_de_prensa.cfm?iid=21022013transgenicos)).

El incremento de superficie destinada a maíz Bt radica en razones agronómicas, económicas y de facilidad de manejo que suponen ventajas destacables para el agricultor frente a las variedades convencionales.

Para el caso de *P. xylostella* (insecto de estudio de la presente tesis) existen cultivos Bt de colza, col y coliflor que han sido ensayados satisfactoriamente en invernaderos, así como en campo por lo que son excelentes candidatos para ser empleados en programas de CIP, sin embargo por temas de regulación hasta el momento no ha sido posible su puesta en marcha (Russell *et al.*, 2011).

A nivel mundial, el uso comercial de los cultivos transgénicos se centra en la soja, maíz, algodón y colza (**Fig. 17**). En 2012 se alcanzó la cifra record de 170.3 millones de hectáreas de cultivos transgénicos, con un crecimiento anual del 6% desde los 160 millones de hectáreas de 2011. El ranking mundial de los 28 países productores está liderado por EEUU. (69.5 millones ha), Brasil (36.6 millones ha) y Argentina (23.9 millones ha), Canadá (11.6 millones ha) e India (10.8 millones ha). Por primera vez, los países en vías de desarrollo ocupan una superficie mayor de estos cultivos (52%) que los países desarrollados (48%). Dos nuevos países han entrado recientemente en la lista Sudan con algodón Bt y Cuba con maíz Bt (**Fig. 17**) quedando fuera Egipto

(ISAAA, 2012, 2013). Entre 1996 y 2011, los cultivos biotecnológicos han contribuido a aumentar la seguridad alimentaria y a favorecer la sostenibilidad y los efectos del cambio climático, ahorrando el uso de 473 millones de kilos de pesticidas; reduciendo las emisiones de CO<sub>2</sub> en 23100 millones de kilos sólo en 2011, lo que equivale a sacar de la circulación 10 millones de coches; conservando la biodiversidad, con el ahorro de 108.7 millones de hectáreas de cultivo y ayudando a aliviar la pobreza de 15 millones de pequeños agricultores y sus familias (datos Fundación Antama).

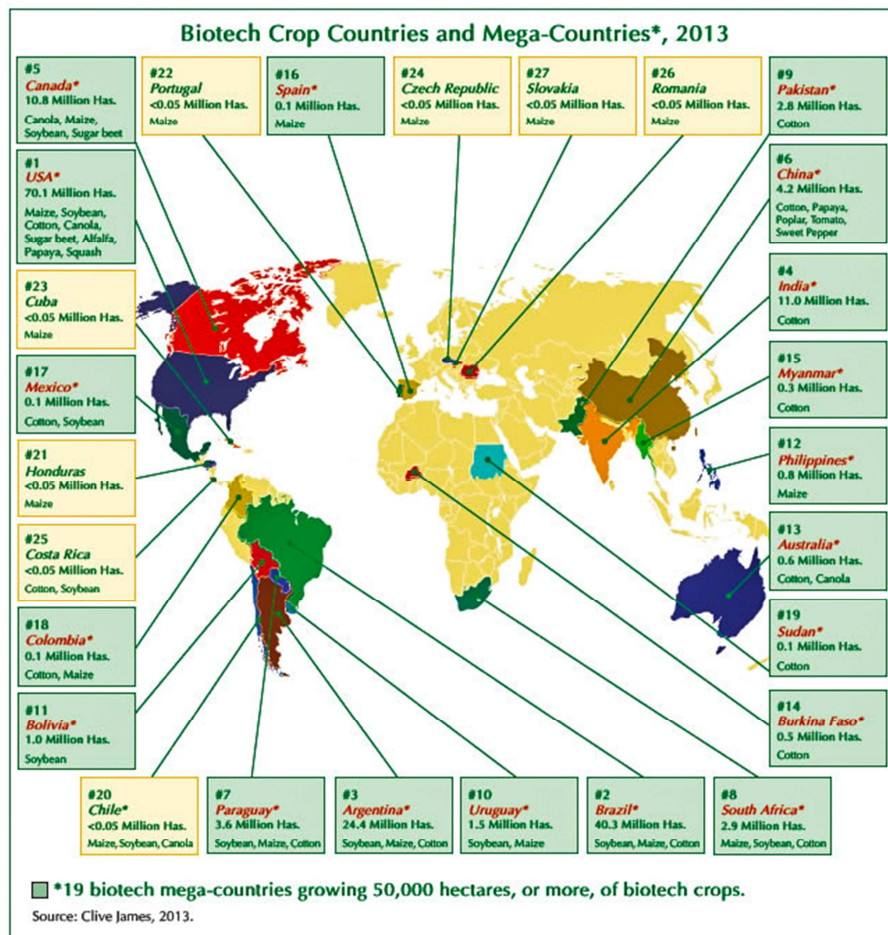


FIGURA 17. Distribución mundial de cultivos transgénicos en 2013. Fte.: ISAAA (2013)



### 3. RESISTENCIA A *Bacillus thuringiensis*

Dada la enorme plasticidad genética que tienen los insectos los insecticidas pueden perder su efectividad. Esta situación se puede encontrar en casos en los que se ejerce un uso no controlado o desmesurado de los productos insecticidas bajo la “necesidad” de incrementar la dosis. La presión de selección es tal, que se seleccionan individuos con fenotipos resistentes a estos productos con el fin de perpetuar en su especie, así pues, los insecticidas, poco a poco, dejan de ser eficaces. De hecho, en 1991 Georghiou y Lagunes (1991) describieron ya la existencia de más de 500 especies de artrópodos resistentes a algún tipo de insecticida. Es por ello que se siempre se aconseje un uso racional de los productos para retrasar la aparición de resistencias aumentando así la vida útil de los productos.

Esta problemática también se ha dado con el uso de productos basados en toxinas Cry, así como en cultivos Bt. El primer caso de resistencia a *B. thuringiensis* se describió en 1985 en una cepa de *Plodia interpunctella*, seleccionada en laboratorio mediante el producto comercial Dipel® (McGaughey, 1985). Desde entonces se han descrito diferentes especies de insectos que han desarrollado resistencia en condiciones de laboratorio pero es el lepidóptero *P. xylostella* el primero insecto capaz en desarrollar resistencia en campo a formulados de *B. thuringiensis* como Dipel® o Xentari® (Ferre y Van Rie, 2002). *Trichoplusia ni* ha sido otro de los lepidópteros ha desarrollado resistencia debido a un uso masivo de productos Bt, pero en este caso la resistencia ha sido detectada en invernaderos (Janmaat y Myers, 2003). Otros casos de resistencia en campo pero en cultivos transgénicos (asociado con una eficacia reducida del cultivo Bt) han sido descritos en maíz Bt: *S. frugiperda* frente Cry1F en Puerto Rico, en *Busseola fusca* frente Cry1Ab en Sudáfrica, *Diabrotica virgifera virgifera* frente Cry3Bb en EEUU; y en algodón Bt: *Helicoverpa zea* frente Cry1Ac en el sudeste de EEUU y *Pectinophora gossypiella* frente Cry1Ac en India (Tabashnik *et al.*, 2013). Hay indicaciones que muestran que algunos de estos casos se desarrollaron como consecuencia

de no seguir estrictamente las recomendaciones incluidas en los planes de CIP.

La resistencia en condiciones de laboratorio tiene sus limitaciones, ya que en estos casos los insectos tienen una variabilidad genética muy limitada, por lo que no deben contener todos los genes de resistencia que se darían en condiciones naturales. Los experimentos de selección en laboratorio no predicen si la resistencia se reproducirá en la naturaleza, ni qué mecanismos de resistencia se están seleccionando, pero resultan muy útiles para estudiar los posibles mecanismos de resistencia que se puedan desarrollar, también para investigar sobre la herencia de este carácter, así como para evaluar la validez de los diferentes sistemas de manejo de la resistencia.

### 3.1 Mecanismos de resistencia

Puede decirse que cualquier cambio dentro del modo de acción de una toxina Bt, desde que es ingerida hasta que manifiesta su actividad tóxica, podría derivar en el fenómeno de la resistencia (**Fig. 18**). Un fallo en la solubilización de los cristales podría detener el proceso tóxico al impedir que las toxinas atravesaran la membrana peritrófica, quedando en el lumen del intestino y excretadas por el insecto (Oppert, 1999). Si la toxina que entra en contacto con el insecto ya está preactivada, porque su origen es el de una planta transgénica, también podría perder su actividad tóxica por mecanismos como los siguientes: por degradación ante una elevada actividad por proteasas (Shao *et al.*, 1998), por ser secuestradas por moléculas de la membrana peritrófica o por ser precipitadas o coaguladas (Ma *et al.*, 2005; Milne *et al.*, 1998). Otros mecanismos de resistencia podrían ser aquellos implicasen cambios en las moléculas de anclaje (aminopeptidasas, caderinas, etc.) que impidiesen la unión irreversible, considerada crucial para la toxicidad (Ferre *et al.*, 1991; Van Rie *et al.*, 1990), o porque el insecto pudiera ser capaz de regenerar rápidamente el tejido dañado tras el proceso tóxico (Loeb *et al.*, 2001).

Los grupos de Gunning *et al.* (2005) y Rahman *et al.* (2007) propusieron dos nuevos mecanismos de resistencia. El primero fue descrito en una cepa de *H. armigera* resistente a Cry1Ac en la que esterasas del intestino medio eran capaces de secuestrar la toxina (Fig. 18). En el segundo, mediante una dieta con concentraciones subletales de la toxina Cry1Ac en el lepidóptero *Ephestia kuehniella*, se mostró que la tolerancia que presentaban las larvas del insecto estaba correlacionada con una respuesta inmune elevada, traducida como una producción de moléculas coagulantes, como la lipoforina (Rahman *et al.*, 2007), capaces de formar agregados insolubles con las toxinas. En *H. armigera* la hexamerina es la molécula que interactúa con la toxina Cry1Ac formando agregados vinculados al sistema de respuesta inmunológica (Fig. 18) (Ma *et al.*, 2005). En el nematodo *C. elegans* se mostró que la exposición a la toxina Cry5B activaba una ruta de defensa inmunológica tipo quinasas (Huffman *et al.*, 2004). También se ha propuesto un nuevo mecanismo de resistencia basado en lo que en inglés se define como *shedding*, o liberación al lumen intestinal, tanto de la APN en *L. dispar* (Valaitis, 2008) como de la ALP en *H. zea* (Caccia *et al.*, 2012) desde su ubicación en las células del epitelio intestinal, para secuestrar a las toxinas Cry1A impidiendo así su unión a membrana.

### 3.1.1 Alteración del procesado proteolítico

En el lepidóptero *P. interpunctella* se vio que este mecanismo de resistencia estaba ligado genéticamente a la supervivencia de una cepa resistente. En esta cepa se observó una lentitud en el procesado de la toxina Cry1Ac, traducido por la ausencia de una proteasa (Oppert *et al.*, 1997). Este mismo mecanismo también se corroboró para la toxina Cry1Ab (Herrero *et al.*, 2001b), así como, en *O. nubilalis* (Fig. 18) (Li *et al.*, 2004).

Este tipo de mecanismo también se ha visto en *H. virescens*, pero esta vez por una degradación y eliminación de las toxinas por las proteasas (Forcada *et al.*, 1999). En una cepa resistente de *P. xylostella* también se

observó como la resistencia aumentaba ligeramente al proporcionar una dieta con protoxina Cry1Ca (Liu *et al.*, 2000).

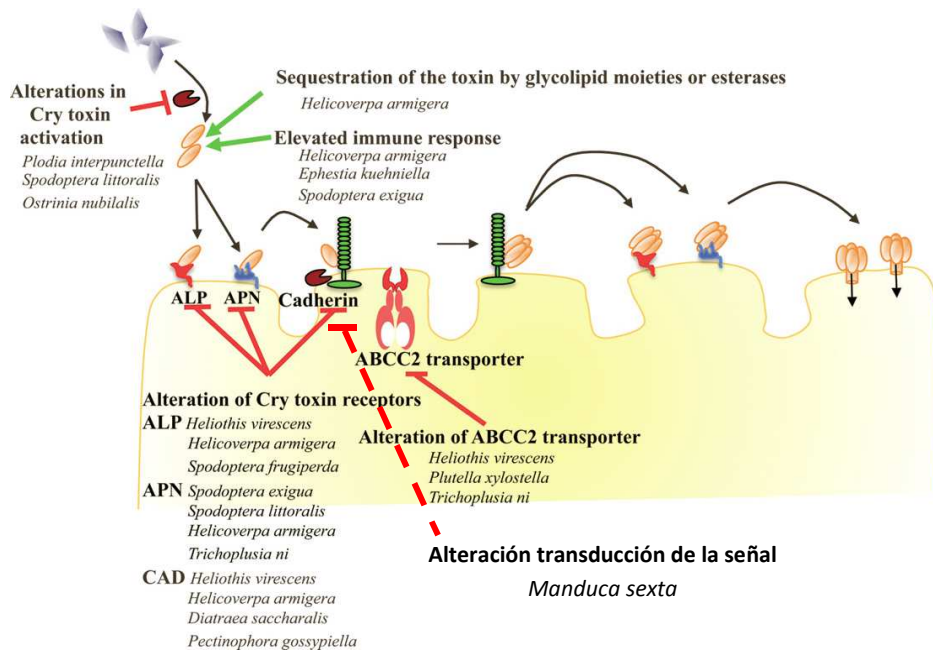
En coleópteros como *Melolontha melolontha* (gusano blanco, afecta a vid, olivo, césped) y *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la patata) también se ha visto este tipo de mecanismo de resistencia (Loseva *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2002).

### 3.1.2 Alteración de la unión a membrana

El mecanismo de resistencia mayoritariamente conocido y que más ha sido corroborado es el de la pérdida de unión de las toxinas Bt (Ferre y Van Rie, 2002). Este mecanismo es el que mayores niveles de resistencia ha expresado y en el que se ha observado la aparición de resistencia cruzada. De hecho, este mecanismo es el que se ha encontrado como responsable de los niveles de resistencia a Dipel® en poblaciones de campo de *P. xylostella* (Ballester *et al.*, 1999; Ferre *et al.*, 1991; Ferre y Van Rie, 2002). Además, es un mecanismo que se da tanto en casos de resistencia recesiva como en dominante (Sayyed *et al.*, 2001; Sayyed y Wright, 2001).

Las alteraciones en la unión pueden ser debidas a la pérdida total de unión de la toxina con el receptor (**Fig. 18**) (Ferre *et al.*, 1991), a una merma de la afinidad (Van Rie *et al.*, 1990), a la disminución en el número de sitios de unión en el intestino medio del insecto (Herrero *et al.*, 2001b), o incluso también existen colonias resistentes a varias toxinas a la vez, pero que sólo estaba alterada la unión a una (Ballester *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1995a). Por esta razón, es importante la caracterización de las moléculas de unión (**Fig. 18**), ya que se podrían desarrollar marcadores que permitieran un seguimiento de la resistencia en campo, así como desarrollar estrategias de prevención de la resistencia con el fin de preservar la utilidad de las toxinas de *B. thuringiensis*. Hasta el momento se han definido como receptores la ALP, APN, caderina y el

transportador ABCC2 en diferentes especies de lepidópteros (Pardo-Lopez *et al.*, 2013) (Fig. 18).



**FIGURA 18.** Esquema de los diferentes mecanismos de resistencia propuestos frente a las toxinas Cry en lepidópteros. Se añade el modelo de transducción de la señal propuesto por Zhang *et al.* (2006). Fte.: Adaptado de Pardo-López *et al.*, (2012).

Existen casos en los que elevados niveles de resistencia no se han podido relacionar con alteraciones en la unión. Por ejemplo, dos colonias de *P. xylostella* seleccionadas con Cry1Ca mostraron ser resistentes a ésta, una con una tasa de resistencia de 63 y la otra de 19 (Liu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000), y sin embargo, apenas presentaron alteración ni en la afinidad por los sitios de unión ni en su concentración.

Este mecanismo de resistencia es reversible, ya que colonias resistentes de *P. xylostella* han dejado de serlo al parar la presión de selección y con ello se

ha visto el paso de no unión a poder unir la toxina con la que habían sido seleccionadas mediante experimentos de unión con BMV (Tabashnik *et al.*, 1994a).

### **3.2 Genética de la resistencia**

Las estrategias a seguir para el control de la resistencia dependen, en gran medida, de un conocimiento previo de las bases genéticas de la misma. De esta forma, un conocimiento del número de genes implicados, la relación entre ellos, las relaciones de dominancia entre alelos, si son autosómicos o ligados al sexo, y la ecología de la plaga, permitirían prevenir la aparición de la resistencia, o al menos retrasarla (Tabashnik *et al.*, 2009).

En campo, el alelo de la resistencia suele estar presente pero en una baja proporción, de esta forma al iniciar una línea resistente en laboratorio puede que se muestre monogénica debido a que se aumenta la frecuencia del alelo tras la presión de selección en laboratorio. Además, en una población de laboratorio es improbable que tengamos el alelo principal de la resistencia y, por tanto, ésta aparece como el resultado de varios genes. Una solución para minimizar este problema es iniciar la selección a partir de una muestra de una población previamente tratada con el insecticida, de modo que la frecuencia del alelo sea mayor. Otra solución sería comenzar la selección con una muestra mayor de individuos.

El método más utilizado para estudiar la herencia de la resistencia es la realización de cruces entre cepas susceptibles y resistentes, evaluando el fenotipo de la progenie mediante bioensayos, determinando la  $CL_{50}$  (dosis a la que mueren el 50% de los individuos).

### 3.2.1 Variabilidad genética

Una aproximación para evaluar el potencial de las poblaciones de insectos en desarrollar resistencia a Bt es determinar los niveles de susceptibilidad basal dentro y entre las poblaciones. Generalmente, existen más estudios que calculan la variabilidad interpoblacional que la intrapoblacional. Se ha visto que cuando la variabilidad interpoblacional es baja, no significa que las poblaciones no puedan desarrollar resistencia, pues muchas poblaciones, cuyas diferencias entre ellas son poco significativas, responden rápidamente ante una presión de selección con toxinas Cry, posiblemente debido a que existe una elevada variabilidad intrapoblacional que permite una rápida respuesta (Ferre y Van Rie, 2002). Por ejemplo, en el estudio de Huang *et al.* (1997) se comparó la susceptibilidad basal entre cinco poblaciones de *O. nubilalis* procedentes de tres sitios diferentes de EEUU; se encontraron con pocas diferencias entre ellas, pero esto no impidió que respondieran rápidamente frente a una intensa presión de selección.

También se han encontrado casos de elevadas diferencias interpoblacionales, como las encontradas entre once colonias de *Helicoverpa zea* (441 veces de diferencia) y entre ocho colonias de *S. exigua* (554 veces de diferencia) (Luttrell *et al.*, 1999).

### 3.2.2 Frecuencia inicial de los alelos de resistencia

Dentro del estudio de la resistencia y de su prevención en campo, es importante el cálculo de la frecuencia inicial de los alelos de resistencia a las toxinas Cry, con el fin de saber cómo la resistencia puede evolucionar con el tiempo bajo tratamientos insecticidas periódicos. De hecho, la disminución de la susceptibilidad en campo frente a un tipo de toxina Cry en una especie de insecto plaga no significa que haya desarrollado resistencia a ésta si no se demuestra que la frecuencia de los alelos de resistencia aumentan con el

tiempo. Las poblaciones de insectos presentan una variación genética natural que afecta a la respuesta frente a las toxinas Cry, pues presentan alelos que le confieren susceptibilidad y otros que le confieren resistencia. La presencia de éstos últimos suelen ser rara ( $<10^{-3}$ ) en una población de insectos en condiciones naturales antes de que estén expuestas a las toxinas Bt. Así, la resistencia en campo aparece cuando una población es expuesta a toxinas Cry y aumenta la frecuencia de los alelos que le confieren resistencia en las generaciones siguientes (Tabashnik *et al.*, 2009).

El método más sensible para averiguar la frecuencia de alelos de resistencia es el propuesto por Andow y Alstad (1998), el cual se fundamenta en el análisis de la resistencia en la descendencia F2 procedente de isóneas de parejas capturadas en campo mediante bioensayos. Con este método se han llegado a estimar frecuencias entre  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  en diferentes especies de insectos. Otro método, pero menos sensible, es el propuesto por Gould *et al.* (1997) en el que se cruzan machos capturados en campo con hembras de cepas resistentes de laboratorio, y tras ello se analiza la resistencia en las generaciones F1 y F2. La principal desventaja de este último método es que únicamente se detectan aquellos alelos de resistencia comunes a los de la cepa de laboratorio. Con este método se han llegado a estimaciones de  $10^{-3}$ .

Diferentes estudios publicados sobre este tema han estimado la frecuencia inicial de los alelos de resistencia en campo antes de ser tratados con productos Bt. El primero de ellos estimaba esta frecuencia alrededor de  $1.5 \cdot 10^{-3}$  en individuos recolectados en campo de una población de *H. virescens* (Gould *et al.*, 1995). Posteriormente, otros estudios orientados en esta misma dirección han estimado frecuencias de  $10^{-2}$  en *P. gossypiella* (Tabashnik *et al.*, 2003), de  $8.6 \cdot 10^{-3}$  en el taladro del maíz *S. nonagroides* (Andreadis *et al.*, 2007) o de  $<10^{-3}$  en otro taladro del maíz *O. nubilalis* (Stodola *et al.*, 2006; Engels *et al.*, 2010). La determinación de la frecuencia de alelos de resistencia tras la introducción de las plantas Bt es muy útil con el fin de averiguar realmente la eficacia de los diferentes métodos de control de la aparición de la resistencia.



Ejemplos de ello, lo encontramos en casos como los de poblaciones australianas de *H. armigera* y *H. punctigera*, tras la introducción del algodón Bt, se estimó la frecuencia de los alelos de resistencia frente a Cry1Ac y Cry2Ab. En *H. armigera* la frecuencia de los alelos de resistencia aumentaba con el tiempo para Cry1Ac (menor de  $3.2 \cdot 10^{-3}$ ) y para Cry2Ab ( $2.2 \cdot 10^{-2}$ ) desde el período de 2007 a 2010 (Tabashnik *et al.*, 2013). Sin embargo, en *H. punctigera* se mantuvo la frecuencia de los alelos de resistencia a Cry2Ab en  $9.1 \cdot 10^{-3}$  durante la temporada 2004-2010 (Tabashnik *et al.*, 2013). La estimación de la herabilidad ( $h^2$ ) también ha sido empleada como un parámetro para conocer el potencial de evolución de la resistencia en una población, ya que informa sobre el papel que juega el componente genético en la variabilidad del fenotipo de la resistencia en una población objeto de estudio (Tabashnik *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1999; Hernandez-Martinez *et al.*, 2009; Crava *et al.*, 2013)

### 3.2.3 Herencia de la resistencia

Tras la comercialización de las plantas transgénicas Bt, el conocimiento del modo de herencia de los genes de resistencia cobra mayor importancia debido a que, dependiendo de cómo sea, se aplicará una tipo u otro de estrategia de manejo de la resistencia.

Generalmente, el grado de dominancia se obtiene mediante bioensayos con mezclas de esporas y cristales, a una dosis dada ( $D_{LM}$  o dominancia efectiva) o bien estimando los valores de  $CL_{50}$  ( $D_{CL}$ ) mediante curvas de dosis-respuesta.

El parámetro  $CL_{50}$  que se obtiene indica la relación entre homocigotos susceptibles, homocigotos resistentes y heterocigotos, y con el se puede calcular el grado de dominancia  $D_{CL}$  según la fórmula:  $D_{CL} = (\log CL_{RS} - \log CL_S) / (\log CL_R - \log CL_S)$  donde  $CL_{RS}$ ,  $CL_S$  y  $CL_R$  se corresponden con las concentraciones letales medias de los heterocigotos y

homocigotos sensibles y resistentes, respectivamente (Bourguet *et al.*, 2000). En el caso del grado de dominancia calculada como  $D_{LM}$ , puede variar en función de la concentración ensayada, ya sea, a partir de un formulado o de plantas transgénicas; a este tipo de dominancia la llaman como “dominancia efectiva” (Ferre y Van Rie, 2002). Estos valores nos dan una aproximación de la herencia de la resistencia en situación de campo, aunque no son plenamente extrapolables, ya que no tienen en cuenta la eficacia biológica que confiere a los individuos el tener un alelo de resistencia en áreas tratadas, lo que podría ser calculado mediante la “dominancia de la eficacia relativa en áreas tratadas” o  $D_{LW}$ . Sin embargo, el parámetro  $D_{LW}$  es muy difícil de estimar en condiciones de campo ya que es complicado controlar todos los factores que influyen en la eficacia biológica. La estimación de estos parámetros de dominancia se realiza mediante la siguiente fórmula:  $D_X = (X_{RS} - X_{SS}) / (X_{RR} - X_{SS})$ , donde  $X_{RR}$ ,  $X_{SS}$  y  $X_{RS}$  se corresponden con los valores cuantitativos del carácter para los homocigotos resistentes, sensibles y heterocigotos, respectivamente.

El rango de valores que pueden tomar todos estos parámetros de dominancia es el mismo,  $D=1$  como completamente dominante y  $D=0$  como completamente recesivo (Bourguet *et al.*, 2000).

A grandes rasgos, la resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis*, suele ser autosómica, aunque en algunos casos se ha observado una ligera influencia del sexo (Sayyed y Wright, 2001; Sayyed *et al.*, 2005). Normalmente, la resistencia se ha caracterizado por ser parcialmente recesiva, aunque existen casos en los que se ha encontrado que la resistencia era parcialmente dominante (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001b; Sayyed *et al.*, 2000; Sayyed y Wright, 2001; Sayyed *et al.*, 2003).

La herencia en los casos de resistencia encontrada en campo, asociada con una eficacia reducida de los cultivos Bt, ha sido de carácter recesiva. Estos casos son los de *S. frugiperda* frente Cry1F en maíz transgénico Bt en Puerto Rico, en *Busseola fusca* frente Cry1Ab también en maíz Bt en Sudáfrica y en

*H. zea* frente Cry1Ac y Cry2Ab en algodón Bt en el sudeste de Estados Unidos (Tabashnik *et al.*, 2009).

### 3.3 Resistencia cruzada

La resistencia cruzada, o resistencia múltiple, se produce en una población de insectos que ha sido expuesta a cierto insecticida para el que ha desarrollado finalmente resistencia y que además, presenta resistencia a otro insecticida al que nunca había estado expuesta. Entonces se dice que el primer insecticida ha producido resistencia cruzada al segundo y normalmente se debe a que ambos insecticidas tienen en común el mismo mecanismo de acción. En *B. thuringiensis* se habla de dos niveles de resistencia cruzada, uno en el que se observa que la aparición de resistencia a un aislado de *B. thuringiensis* ha desarrollado resistencia cruzada a otro aislado diferente (McGaughey y Johnson, 1987). El otro nivel implica la aparición de resistencia cruzada entre toxinas individuales. Ejemplos de este último caso aparecen en cepas resistentes de *P. xylostella* (Sayyed *et al.*, 2000; Tabashnik *et al.*, 1994b; Tabashnik *et al.*, 1997b), en *H. virescens* (Gould *et al.*, 1995) y *S. exigua* (Hernandez-Martinez *et al.*, 2009; Moar *et al.*, 1995).

Los ensayos de unión de las toxinas Cry han revelado una estrecha correlación entre el desarrollo de resistencia cruzada y la existencia de sitios de unión comunes para estas toxinas. Se ha observado que toxinas que comparten el mismo sitio de unión, al desarrollarse resistencia a una de las toxinas, se puede desarrollar también resistencia para el resto de las toxinas que lo comparten. Este es el caso de *P. xylostella*, en que algunas cepas de este insecto (procedentes de Hawái y Pensilvania) seleccionadas con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (contiene toxinas Cry1A y Cry2) desarrollaron resistencia cruzada a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa y Cry1Ja. Estudios de unión demostraron que las cuatro primeras compartían los mismos sitios de unión (Ballester *et al.*, 1999; Granero *et al.*, 1996; Tabashnik *et al.*, 1997b). Un caso

similar ocurrió con la cepa YHD2 de *H. virescens* la cual también desarrolló resistencia a 5 toxinas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa y Cry1Ja) las cuales también compartían sitios de unión comunes (Jurat-Fuentes y Adang, 2001). La determinación del modelo de unión de las distintas toxinas Cry permite predecir el desarrollo de resistencia cruzada antes de que esta ocurra.

No siempre aparece resistencia cruzada pues existen casos como es el ejemplo de *T. ni* en la que no se encontró resistencia cruzada para las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac en una cepa seleccionada con Cry1Ab (Estada y Ferre, 1994). Tampoco se encontró resistencia cruzada a Cry1Aa y Cry1Ac en una población de *P. xylostella* de Filipinas (cepa PHI), muy resistente a Cry1Ab (Ballester *et al.*, 1994). En el mosquito *Culex quinquefasciatus* hasta el momento no se han encontrado casos de resistencia cruzada en campo frente preparados de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (mezcla de toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A) posiblemente debido al distinto modo de acción entre las toxinas Cry y Cyt. Sin embargo, en experimentos de selección en laboratorio sí se ha podido obtener resistencia cruzada entre las toxinas Cry2A, Cry2B y Cry4A+Cry4B (Wirth *et al.*, 2010).

Finalmente, se podría incluir otro nivel en la que la aparición de resistencia a *B. thuringiensis* repercute en la aparición de resistencia cruzada a otro tipo de insecticida. Es el caso de una cepa resistente a Cry1Ac de *P. xylostella* la cual también parece haber desarrollado resistencia al piretroide insecticida deltametrina (Sayyed *et al.*, 2008). Este tipo de casos se deben a que esterases no específicas, tanto del intestino como de la hemolinfa, sequestran e hidrolizan a ambos tipos de moléculas, tanto a las toxinas Cry (Gunning *et al.*, 2005) como a moléculas sintéticas como son organofosforados, carbamatos y piretroides (Li *et al.*, 2007). De esta forma, al compartir el mismo mecanismo de acción, puede que sea la causa de la aparición de este tipo de resistencia cruzada.

### 3.4 Estrategias de prevención de la aparición de la resistencia

La estrategia más efectiva para evitar el desarrollo de resistencia a cualquier insecticida es, simplemente, evitar el abuso de él, pues así, se ayuda a disminuir la presión de selección. Sin embargo, si la resistencia ya se ha desarrollado se puede emplear un buen programa CIP donde se describen las tácticas o medidas que deben tomarse para prevenir o manejar la resistencia al plaguicida para una plaga específica. El objetivo es el de reducir la selección de los genes de resistencia en una población de plaga. Las tácticas deben ser diseñadas para mantener una alta frecuencia de genes susceptibles y una baja de genes resistentes en la población de la plaga mediante la reducción de la presión de selección, a la vez que se aporta el nivel necesario de control de la plaga. Estos requisitos pueden ir desde usar las dosis recomendadas de aplicación, reducir el número de aplicaciones, rotar compuestos no relacionados, emplear productos no específicos, uso de enemigos naturales como depredadores o parasitoides, etc. (James, 2012) Con todo ello se puede alargar la vida útil de los insecticidas existentes en el mercado y evitar así recurrir al desarrollo de nuevos con el coste que ello supone.

Los cultivos transgénicos, transformados por la inserción de uno o más genes de toxinas de *B. thuringiensis*, tienen varias ventajas con respecto al manejo de la resistencia. Una ventaja importante es que a pesar de que estas plantas insecticidas presentan un efecto tóxico permanente, los niveles no llegan a ser tan elevados que empleando insecticidas convencionales, ya que por problemas de cobertura o de degradación del ingrediente activo, muchas veces los agricultores se ven obligados a repetir las aplicaciones, lo que con frecuencia acaba en casos de desarrollo de resistencia. Además, desde el inicio en la comercialización de una planta transgénica se llevan a cabo sistemas de prevención de desarrollo de resistencias, cosa que no ocurre con el sistema convencional en el que el problema surge cuando el fenómeno de la resistencia ya está presente. A pesar de ello, aunque el potencial para la selección de resistencia con las plantas transgénicas es, por comparación, más reducido, no

se elimina completamente. Por ello, con la aprobación de los primeros cultivos transgénicos en 1995, la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EEUU (EPA) propuso diversas estrategias para retrasar el desarrollo de resistencias. Estas estrategias, en continua revisión, son: reducción de la exposición de los insectos a las toxinas, empleo de refugios combinado con altos niveles de expresión de toxina, expresión de varias toxinas en la misma planta, siembra en mosaico y combinación con otros métodos de control (Tabashnik, 2008).

### 3.4.1 Estrategia del refugio

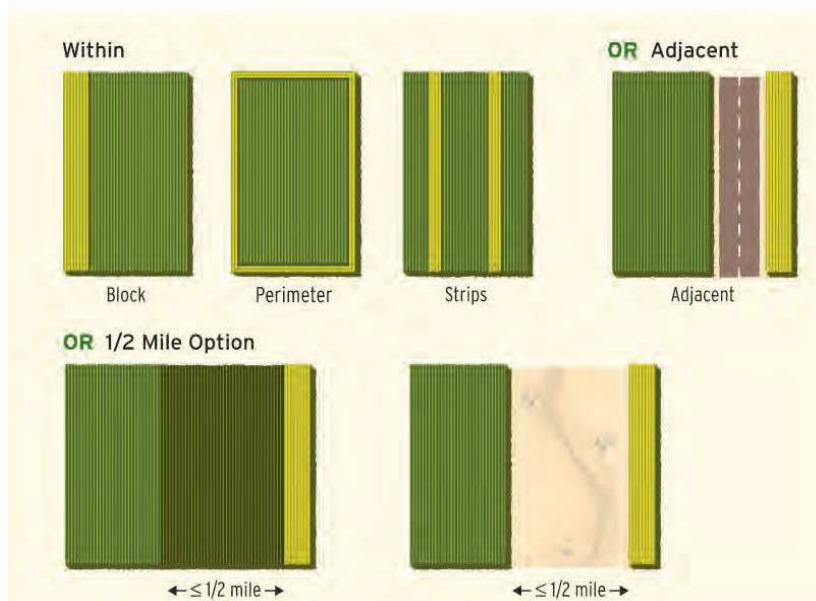
Esta estrategia ha sido empleada de forma principal en todo mundo para retrasar la aparición de la resistencia. Los refugios son parcelas con plantas que no expresan toxina (**Fig. 19**). El concepto que subyace a este método se basa en que los pocos individuos resistentes que pueden aparecer en una plantación Bt se puedan cruzar con una mayoría de individuos susceptibles que se hospedan en los refugios. Si la herencia de la resistencia es recesiva (o parcialmente recesiva) la progenie resultante será susceptible a los cultivos Bt y morirá retrasando así de forma considerable la aparición de la resistencia.

Esta estrategia a veces también se denomina “estrategia de refugio combinado con una elevada dosis de toxina” debido a que la eficacia de este sistema se mejora si la dosis que expresa el cultivo Bt es lo suficientemente elevada para poder eliminar a todos (o casi todos) los individuos heterocigotos de la progenie. La teoría indica que tres factores son clave para el éxito de la estrategia del refugio: que la herencia de la resistencia sea recesiva, que haya una baja frecuencia de alelos resistentes y que existan abundante número de refugios cerca de los cultivos Bt (Tabashnik, 1994; Tabashnik *et al.*, 2009). Otro factor adicional también puede predecir el retraso de la aparición de la resistencia: el coste biológico (Gould, 1998). Éste se basa en que en los refugios el coste biológico sea mayor en los individuos resistentes que en los

susceptibles. Ante el caso de una herencia dominante de la resistencia, la EPA especifica que los cultivos Bt deben de expresar elevadas dosis de toxina que permita eliminar el 99.99% de los insectos susceptibles en campo, pues este tipo de herencia es considerada como un grave problema. Además también se aconseja aumentar el número de refugios, por ejemplo los datos sugieren que para un único locus con dos alelos, con una frecuencia inicial de los alelos del 0.001, si la resistencia es recesiva puede retrasarse durante más de 20 años con un 5% del área cultivada como refugios y si la resistencia es parcialmente dominante con un 50% del área cultivada destinada a (Huang *et al.*, 2011).

Los modelos matemáticos predicen que el desarrollo de la resistencia puede ser más lento si la frecuencia inicial de los alelos de resistencia es baja. Diferentes publicaciones proponen que el éxito del refugio radica en que la frecuencia inicial de los alelos de resistencia sea  $< 0.001$ , sin embargo estos mismos modelos indican que con una frecuencia inicial del 0.3, si los alelos presentan un coste biológico elevado, los refugios también pueden retrasar la resistencia de forma efectiva (Carriere y Tabashnik, 2001).

La efectividad de esta estrategia puede verse mermada si consideramos determinadas situaciones como son, por ejemplo, que individuos susceptibles y resistentes presenten diferentes estados de desarrollo (ya que los alelos de resistencia pueden conllevar un coste biológico) por lo que su apareamiento se vería impedido (Liu *et al.*, 1999). También existe el riesgo de que las plantas transgénicas expresen los genes *cry* de forma variable (Dong y Li, 2007), por lo que la funcionalidad de los refugios disminuiría o que la frecuencia de los alelos de resistencia fuera más elevada de lo esperado.



**FIGURA 19.** Diferentes diseños y localizaciones de refugios (verde claro) en un cultivo de maíz Bt cuando representan el 20% de área total del cultivo. El verde más oscuro representa otro cultivo diferente. En estos casos se aconseja aplicar un insecticida (no basado en Bt) sobre los refugios en el caso excepcional de que se observen en éstos indicios de daños que puedan ser económicamente relevantes. Fte.: IRM Grower Guide 2013 (For U.S. corn and cotton growing areas). Monsanto

### 3.4.2 Expresión de varias toxinas en la misma planta

Esta estrategia se basa en que una misma planta pueda expresar dos toxinas a la vez. A través de modelos matemáticos se ha determinado que este sistema es mucho más eficiente (el desarrollo de resistencia se retrasa durante un periodo de tiempo mayor) que si empleasen diferentes plantas expresando diferentes toxinas por separado, sembradas a través de parches (mosaico) o de forma secuencial (Roush, 1998). Este método se basa en que los insectos resistentes a una de las toxinas serán eliminados por la acción de la otra toxina y viceversa. Las premisas más importantes para la efectividad de este método de control son (además de las incluidas para la estrategia del refugio) la



ausencia de resistencia cruzada entre las distintas toxinas empleadas y que los insectos sean altamente susceptibles a ambas toxinas por separado (Brevault *et al.*, 2013).

Resultados de campo con algodón Bt en EEUU (con *H. zea*) y Australia (con *H. armigera* y *H. punctigera*) han mostrado que esta estrategia puede ver mermada su efectividad si se cultivan simultáneamente plantas que expresan dos toxinas con plantas que solo expresan una de ellas (Tabashnik *et al.*, 2013). En EEUU los agricultores cultivaron algodón que solo expresaba la toxina Cry1Ac junto con algodón que expresaba Cry1Ac y Cry2Ab desde 2004 a 2010, ello hizo que la frecuencia de la resistencia para ambas toxinas superase el 50% para algunas poblaciones de *H. zea*. Sin embargo, en Australia los agricultores ya en el 2004 reemplazaron completamente el algodón transgénico con Cry1Ac por el que expresaba ambas toxinas, por lo que la frecuencia de la resistencia no superó el 1% para *H. armigera* y *H. punctigera* (Tabashnik *et al.*, 2013).

A través de esta estrategia se complementa con el empleo de los refugios lo que a su vez permite disminuir su tamaño de forma considerable (Roush, 1998).

### 3.4.3 Otros métodos de control

Se están llevando a cabo otros métodos de control en combinación con el sistema de plantas Bt, por ejemplo, en EEUU se están desarrollando cultivos transgénicos que expresan proteínas Vip junto con proteínas Cry (Tabashnik *et al.*, 2009) los cuales se prevé que se empleen en Australia (Mahon *et al.*, 2012). También se baraja la posibilidad de poder desarrollar cultivos transgénicos con proteínas Cry modificadas, más eficientes frente determinadas cepas de insectos resistentes (Pardo-Lopez *et al.*, 2013; Tabashnik *et al.*, 2011). Finalmente, se está estudiando la viabilidad de

desarrollar plantas transgénicas con ARN<sub>i</sub> con diana frente a determinados genes de interés para impedir su correcta expresión (Zhang *et al.*, 2013).

### 3.5 Estabilidad de la resistencia

La estabilidad de la resistencia en una población dada dependerá principalmente del efecto de los genes de resistencia, u otros genes asociados a ellos, sobre la eficacia biológica de la población. Generalmente, la adquisición de la resistencia va en detrimento de la eficacia biológica de los insectos, que normalmente se traduce en cambios en la duración del desarrollo, en la tasa de crecimiento, en la masa corporal, en la supervivencia y en la reproducción (virilidad, fecundidad y viabilidad de los huevos) (Gassmann *et al.*, 2009). Es por ello que en la mayoría de los estudios de selección con *B. thuringiensis*, tras cesar la presión de selección, la resistencia revierte hasta niveles próximos a los de la población inicial (Gassmann *et al.*, 2009; Tabashnik *et al.*, 1994a). Con menor frecuencia también se han dado casos en que la población se ha mantenido estable tras varias generaciones sin selección (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001a; Sayyed *et al.*, 2004).

## 4. INSECTOS DE ESTUDIO

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

*P. xylostella* o comúnmente llamada «palomilla dorso de diamante» por presentar tres marcas en forma de diamante en el dorso del adulto, es de origen mediterráneo y habita principalmente en las zonas tropicales y subtropicales, pues es un insecto que no resiste el frío intenso. Se considera una importantísima plaga de las crucíferas, sobre todo de la coliflor, repollo, brócoli, rábano, col de Bruselas y diversas especies silvestres como la mostaza

y mostacilla. También se alimenta de crucíferas silvestres, las cuales utiliza como refugio hasta que llega el momento de plantación de los cultivos.

#### **4.1.1 Biología**

Su ciclo suele completarlo en dos semanas, aunque depende de las condiciones ambientales, especialmente de la temperatura. Al año puede presentar hasta seis ciclos en su estado natural. Su ciclo biológico consta a grandes rasgos de cuatro estadios, el de huevo, larva, pupa y adulto (**Fig. 20**)

Los huevos son muy pequeños de menos de 1 mm, su coloración es amarillenta (**Fig. 20**). La puesta suele hacerse en el envés de la hoja cerca de la vena central de las hojas. Una hembra puede llegar a poner de 40 a 50 huevos por día, pudiendo llegar a ovipositar un total de 265 huevos durante su tiempo de vida (Rosario y Cruz, 1986).

Las larvas suelen medir entre 8-12 mm de largo presentando desde una tonalidad amarillenta a verde oscuro conforme se van desarrollando (**Fig. 20**). Presentan cuatro estadios con una duración de 10 días a 28 °C (Mora, 1990) los dos últimos son en los que mayor daño provocan. Se localizan en el envés de las hojas en el que excavan sus galerías mientras se alimentan, dejando una especie de ventana en el revés de la hoja que se corresponde con la fina película de cera de la hoja. Primero se alimentan de las hojas más exteriores, para luego progresar hacia las hojas interiores donde pupan. Las larvas tejen un hilo de seda que utilizan para dejarse caer de las hojas en caso de verse ante una situación de peligro. En el momento cesa las larvas suelen remontar hasta ubicarse de nuevo en las hojas de la planta.

El tamaño de la pupa suele estar entre los 10-12 mm y la duración en este estadio es de unos 6-8 días. Su coloración es verde oscuro presentando exteriormente una coloración blanca por el capullo de seda que se forma

(Fig. 20). Suele localizarse también en el envés de la planta, por lo que es difícil su eliminación.

Los adultos de 8-10 mm son de color café grisáceo (Fig. 20). Son visibles por su mayor actividad al atardecer y durante la noche. Beben pequeñas gotas de agua o rocío. Se aparean en el atardecer del primer día de su salida del capullo, y las hembras ovipositan rápidamente. La longevidad de los adultos depende de si son machos o hembras siendo alrededor de 6-21 días o de 7-14 días, respectivamente (Rosario y Cruz, 1986).



**FIGURA 20.** Ciclo biológico del lepidóptero *P. xylostella*. Fotografías tomadas de <http://www.cropscience.bayer.com>

#### 4.1.2 Daños y resistencia

En épocas secas los daños de este insecto se acentúan mucho más debido a la ausencia de agua de lluvia que arrastra a las larvas. Se considera una de las plagas más importante del mundo, debido a su gran potencial reproductivo y en relación con ello, a la capacidad que tiene en desarrollar resistencias. De hecho, *P. xylostella* fue el primer insecto en desarrollar resistencia al DDT en campo (Ankersmit, 1953) y también ha sido el primer insecto capaz de desarrollar resistencia en campo a *B. thuringiensis* (Tabashnik, 1990). En la actualidad ha desarrollado resistencia a todos los insecticidas sintéticos empleados para su control en campo (**Tabla 3**), sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales donde la producción de los cultivos es prácticamente continua, y donde, por ejemplo en el caso de Malasia, más del 90% de los agricultores emplean entre 3 y 4 tipos de insecticidas químicos frente *P. xylostella* durante 10-12 semanas llevando a cabo aplicaciones de 1 a 2 por semana (Furlong *et al.*, 2013). Además hay trabajos (como se ha comentado en el apartado 3.3) donde se observa la aparición de resistencia cruzada entre productos Bt e insecticidas químicos de tipo piretroide en poblaciones de *P. xylostella* de Malasia probablemente debido a mecanismos de resistencia de tipo metabólico (Sayyed *et al.*, 2008). De la misma manera también se han encontrado casos en poblaciones de campo de resistencia múltiple donde diferentes mecanismos de resistencia se combinan para dar resistencia a múltiples clases de insecticidas químicos (**Tabla 3**) (Iqbal y Wright, 1997; Pu *et al.*, 2010). Todo ello unido al reducido éxito de sus enemigos naturales debido al empleo de insecticidas de amplio espectro, así como a la introducción de especies en climas no adecuados, hace que sea una de las plagas más importantes del mundo superando el millón de dólares al año en su control.

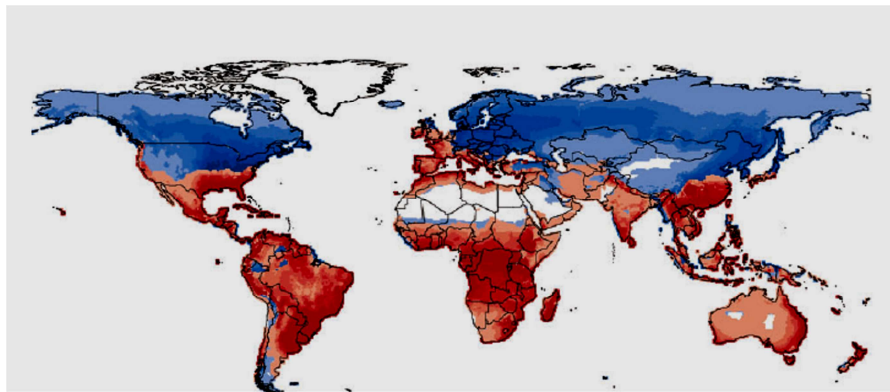
**TABLA 3. Recopilación de casos de resistencia en campo a insecticidas de *Plutella xylostella*.** Mecanismos de acción: MFO (función oxidasa mixta), GST (Glutation-S-transferasa), CNa (canales de Na<sup>+</sup>). Modo de herencia: I (dominancia o recesividad incompleta), R (recesiva), D (dominante). (-) No determinado. Adaptación del trabajo de Furlong *et al.*, 2012

Insecticida	País	Mecanismo	Genética
<b>Organofosfato</b>	Australia, China, Costa Rica, India, Nicaragua, Pakistán, Filipinas, Sudáfrica, Corea del Sur	MFO, GST, esterasas	-
<b>Carbamato</b>	China, India, Sudáfrica, Corea del Sur, Taiwán	-	-
<b>Piretroide</b>	Australia, Brasil, China, India, Japón, Malasia, Nueva Zelanda, Nicaragua, Pakistán, Filipinas, Sudáfrica, Corea del Sur, EEUU	MFO, GST, esterasas, CNa	ID/ I, poligénica
<b>Indoxacarb</b>	Australia, Brasil, Malasia, EEUU, Pakistán	MFO, GST, esterasas	I, monogénica
<b>Avermectina</b>	Brasil, China, Malasia, Pakistán, Taiwán	MFO, esterasas	I, poligénica
<b>Ciclodieno</b>	India	-	
<b>Fenilpirazol</b>	China, Malasia, India, Taiwán	-	I, monogénica
<b>Espinosad</b>	Malasia, EEUU, Pakistán, Taiwán	MFO, esterasas	I/IR, monogénica
<b>Nereistoxina</b>	China, India, Taiwán, Nicaragua	-	
<b>Neonicotinoide</b>	Malasia	-	I, monogénica
<b><i>Bt kurstaki Cry1A</i></b>	América Central, China, India, Malasia, EEUU, Taiwán, Tailandia	Falta de unión a la membrana epitelial del intestino medio	I/IR, monogénica

(Continúa en la página siguiente)

<b><i>Bt aizawai</i> Cry1C</b>	Malasia, EEUU, Taiwán, Tailandia	-	-
<b>Benzoilurea</b>	Brasil, China, Japón, Malasia, Nicaragua	MFO, esterases	-
<b>Diacilhidracina</b>	China	-	-
<b>Azadiractina</b>	Taiwán	-	-
<b>Diamidas antranílicas</b>	China	-	-

A todo ello se une la facilidad que presenta en su desplazamiento entre cultivos aprovechando la dirección de los vientos lo que le permite colonizar lugares muy distantes (Fig. 21). Un ejemplo de ello se da cuando consiguen aprovechar las corrientes de viento que se dan entre el sur de EEUU y norte de Méjico para llegar hasta Canadá, a pesar de que es un clima frío consiguen llegar en la época estival más suave por lo que consiguen completar un ciclo biológico (Furlong *et al.*, 2013). En las regiones donde las temperaturas son más elevadas (trópicos y subtropicos) pueden completar varios ciclos biológicos de forma continua por lo que en ciertas áreas del sudeste asiático, América Central, Caribe y sudeste de Estados Unidos, resulta difícil el cultivo de crucíferas debido a la alta incidencia de esta plaga (Fig. 21).



**FIGURA 21.** Predicción de la distribución mundial de *P. xylostella* según modelos bioclimáticos. En rojo se indica donde este lepidóptero puede persistir durante todo el año y en azul donde su presencia es estacional. Fte. Furlong *et al.*, 2012

## 4.2 *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)

### 4.2.1 Modelo de estudio

*Bombyx mori*, también llamado gusano de seda, ha sido utilizado durante más de 5000 años para la producción de seda (Fig. 22) (Xiang, 1995). Es un insecto domesticado que depende totalmente del ser humano para sobrevivir y poder reproducirse. Procede de la domesticación de la variedad silvestre *Bombyx mandarina*. Siempre ha desempeñado un papel fundamental en términos económicos, particularmente en el sector textil desde que surgió la sericultura (Fig. 22). De hecho la llamada Ruta de la Seda fue una de las rutas comerciales más importantes entre Asia y Europa, por transportar un bien muy apreciado entre los romanos y cuyo secreto de elaboración solo conocían los chinos (Kurin, 2002). Actualmente, es la principal fuente de ingresos de más de 30 millones de familias en China, India, Vietnam y Tailandia.



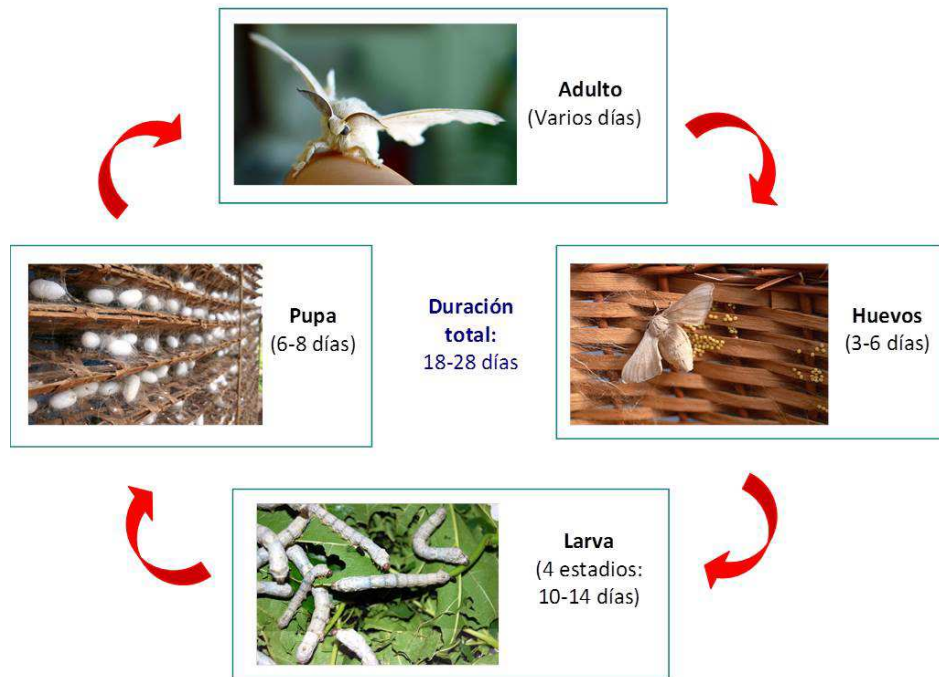
**FIGURA 22.** Tríptico antiguo japonés donde se representa la producción de seda. Se debe observar de derecha a izquierda. Fte. <http://hubpages.com/hub/The-Shiny-History-of-Silk>

Es el segundo insecto que se utiliza como modelo genético experimental desde 1900, por detrás de la mosca de la fruta, debido a su fácil cría y mantenimiento, a la viabilidad de obtener mutantes genéticamente homogéneos y al amplio



conocimiento que existe sobre su biología (Fig. 23) (Goldsmith y Wilkins, 1995). En los inicios debido a su facilidad de cría se han obtenido, mediante cruces genéticos, "razas" o líneas genéticas que han desarrollado por ejemplo, resistencia al virus de la denonucleosis, un patógeno muy virulento en sericultura (Ogoyi *et al.*, 2003), o resistencia a elevados niveles de fluoruro encontrado en las hojas de morera (Lin *et al.*, 1997). Gracias a la facilidad de crear líneas genéticas de interés se ha podido trabajar con marcadores moleculares con el fin de obtener mapas de ligamiento que han permitido la localización de genes de interés, así como, su clonación entre otras aplicaciones. En *B. mori* existen 28 grupos de ligamiento, con cromosomas sexuales Z y W (las hembras son heterogaméticas ZW, y los machos homogaméticos, ZZ), y con ausencia de recombinación en las hembras como la mayor parte de los lepidópteros (Sturtevant, 1915; Traut, 1977).

La aplicación de la tecnología molecular y genómica en *B. mori*, ha permitido desarrollar mapas de ligamiento moleculares, bases de datos de numerosos marcadores moleculares, la secuenciación de su genoma, la transformación de individuos en transgénicos, la aplicación de la técnica del ARNi, etc. Así como ser considerado para el sector de la biotecnología, un importante bioreactor en la producción de proteínas recombinantes (Tamura *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2003). Con todos estos recursos biotecnológicos, *B. mori* es un modelo útil en el estudio de los insectos en cualquier aplicación, y aún más para el estudio de los lepidópteros, el segundo orden más numeroso entre los insectos. En este orden se incluyen muchos insectos plaga tanto de la agricultura como forestales, por lo que gracias al estudio de *B. mori* se han podido desarrollar estrategias de control de plagas, como es el caso que nos ocupa en este trabajo. Obviamente, todos los recursos antes mencionados también son utilizados para la obtención de cepas de interés para una mayor calidad y mejor producción de seda, de forma más rápida que mediante los cruces genéticos clásicos (Goldsmith *et al.*, 2005).



**FIGURA 23.** Ciclo biológico del lepidóptero *P. xylostella*. Fte. fotografías: adulto, Fernando Cuenca; pupas, <http://www.animanaturalis.org>; huevos, <http://www.barresfotonatura.com>

#### 4.2.2 *B. mori* y Bt

En cuanto a la relación entre este lepidóptero y Bt se podría decir que existen más cepas de *B. mori* susceptibles a la toxina Cry1Aa de Bt que al resto (<http://www.glfrc.forestry.ca/bacillus/>). De todas formas, la resistencia a las toxinas Cry es el fenotipo que mayoritariamente predomina en este tipo de insecto, por lo que más que una resistencia se trataría de una tolerancia natural. Posiblemente, la carencia de susceptibilidad puede ser debida a la intensa domesticación de *B. mori* para la obtención de razas resistentes a infecciones de microorganismos patógenos. De hecho, ya en 1901 el bacteriólogo japonés Shigetane Ishiwata (Cherry, 1993) fue primero en aislar *B. thuringiensis* de larvas enfermas de *B. mori*. Actualmente, tal y como hemos

comentado son muchas y diferentes cepas de este lepidóptero las que se usan como modelo en estudios genéticos, entre ellos se encuentran los relacionados con los trabajos con *B. thuringiensis* sobre el mecanismo de acción de las proteínas Cry y el desarrollo de resistencias.

## II. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo la determinación de las bases de la resistencia frente Bt en dos especies de lepidópteros. En *Plutella xylostella*, por ser el primer insecto plaga en desarrollar resistencias en campo y en *Bombyx mori*, como lepidóptero e insecto modelo de estudios genéticos. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

### 1. Búsqueda de marcadores moleculares para el estudio de la resistencia.

1.1 Caracterización molecular de las secuencias de aminopeptidasa N y caderina como posibles marcadores genéticos para futuros estudios de ligamiento genético.

1.2 Estudio de la relación filogenética entre todas las aminopeptidasas N publicadas como potenciales receptores de las toxinas Cry.

### 2. Análisis de la resistencia en *P. xylostella*

2.1 Estudios de ligamiento genético entre diferentes marcadores moleculares asociados a la resistencia en *P. xylostella*.

2.2 Análisis de la resistencia a las toxinas Cry1A en diferentes cepas de *P. xylostella*: SEL-B, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang, a través de su caracterización genética y bioquímica.

### 3. Análisis del mecanismo de tolerancia frente las toxinas Cry en el insecto modelo *B. mori*

3.1 Estudio de la tolerancia a la toxina Cry1Ab en el lepidóptero *B. mori* a través de la determinación de la falta de unión irreversible como mecanismo de tolerancia.

3.2 Determinación de las funciones de las aminopeptidasas N y la caderina en el proceso de unión de la toxina Cry1Ab en *B. mori*



## III. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. INSECTOS EMPLEADOS

Los insectos con los que se ha trabajado en la presente tesis han sido *Plutella xylostella* y *Bombyx mori*, dos especies de lepidópteros de interés en el estudio de la aparición, desarrollo y evolución de resistencias frente a las toxinas Cry de *B. thuringiensis*.

#### 1.1 Cepas de *Plutella xylostella* y mantenimiento en condiciones de laboratorio

Las cepas de estudio de *P. xylostella* LAB-PS y SEL-B fueron mantenidas en el laboratorio del *Departament de Genètica* de la *Universitat de València*. El resto, LAB-UK, Karak, CryAb-SEL y Kluang fueron cedidas por el Dr. Sayyed desde el *Department of Biological Sciences* del *Imperial College London* (Ascot, UK).

**LAB-PS:** esta cepa tiene su origen en la población LAB-P, la cual fue recogida en Hawai y mantenida en EEUU durante más de 200 generaciones sin presión de selección con toxinas Cry (**Fig. 24**) (Liu y Tabashnik, 1998). Posteriormente, una representación de esta cepa fue mantenida en el *Departament de Genètica de la Universitat de València* y se tomó como referencia para diferentes bioensayos. El perfil de susceptibilidad para diferentes toxinas queda reflejado en la **tabla 4** (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001b).

**LAB-UK:** se trata de una cepa susceptible de *P. xylostella* obtenida de Rothamsted Research (Harpenden, Hertfordshire, UK) mantenida en laboratorio durante más de 150 generaciones sin presión de selección con toxinas Cry (**Fig. 24**). El perfil de toxicidad de diferentes toxinas Cry frente a esta cepa se presenta en la **tabla 4**. En ella se muestra un significativo nivel de susceptibilidad frente al producto Dipel<sup>®</sup>, así como frente a Cry1Ac. Las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Fa resultaron ser las menos tóxicas (Sayyed *et al.*, 2004).

**TABLA 4. Toxicidad de diferentes proteínas Cry frente a la cepas susceptibles LAB-PS (González-Cabrera *et al.*, 2001b) y LAB-UK (Sayyed *et al.*, 2004) de *P. xylostella*. Los valores se expresan en µg/ml. (-): no determinado**

Proteína Cry	LAB-PS		LAB-UK	
	CL <sub>50</sub>	LF <sub>95</sub>	CL <sub>50</sub>	LF <sub>95</sub>
Dipel <sup>®</sup>	-	-	0.0039	0.0013 – 0.021
MVP <sup>®</sup>	-	-	0.027	0.012 – 060
Cry1Aa	2.80	1.94 – 4.26	0.039	0.0001 – 0.78
Cry1Ab	1.60	1.35 – 1.90	0.47	0.20 – 1.77
Cry1Ac	0.74	0.50 – 1.16	0.007	0.002 – 0.016
Cry1Fa	-	-	0.20	0.055 – 10.25
Cry1Ja	-	-	0.031	0.010 – 2.23
Cry1Ca	10.55	8.08 – 14.20	0.07	0.023 – 0.177
Cry1Da	19.10	13.20 – 25.00	-	-

**SEL-B:** esta cepa procedía de la selección de la cepa PHI (Ballester *et al.*, 1994) (**Fig. 24**) la cual se caracterizaba por presentar únicamente resistencia frente Cry1Ab con ausencia de unión a esta toxina. Posteriormente, esta cepa se seleccionó con un producto que contenía una protoxina quimérica Cry1Ab-

Cry1Ac, lo que cambió su patrón de resistencia a Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, pero no a Cry1F (Ballester *et al.*, 1994), con ausencia de unión únicamente a Cry1Ab (Tabashnik *et al.*, 1997b). Con estos resultados se propuso que la cepa PHI presentaba dos genes distintos, uno que confería resistencia a Cry1Aa (Tabashnik *et al.*, 1997b) y otro a Cry1Ab (Ballester *et al.*, 1994). Posteriormente, mediante la presión de selección con Cry1Ab activa se obtuvo la cepa SEL-B, la cual con solo tres generaciones desarrolló resistencia frente a Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001b). De hecho, con solo tres generaciones consiguieron recuperar los niveles de resistencia iniciales, pasando de una CL<sub>50</sub> de 2.08 µg/ml a 143 µg/ml. La herencia de la resistencia fue autosómica y de carácter parcialmente recesiva. Además, los ensayos de unión mostraron que las toxinas Cry1Ab como Cry1Ac habían perdido tal capacidad (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001b).

**Karak:** es una población de *P. xylostella* procedente y recolectada en noviembre de 2001 de plantaciones de col china (*Brassica pekinensis*) en la zona de Karak a 54 km del norte de Serdang, en Kuala Lumpur (Malasia) (Fig. 24), donde durante años se aplicaron productos Bt como Dipel® (producto comercial basado en la cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 que produce Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A y proteínas VIP). Esta población se mantuvo en condiciones de laboratorio sin presión de selección durante más de 11 generaciones y aún así, la resistencia fue estable en el tiempo (Sayyed *et al.*, 2004). Es por este carácter especial por el que se determinó su nivel de resistencia a diferentes toxinas y formulados mediante la determinación de la CL<sub>50</sub>. Los resultados mostraron que presentaba niveles de resistencia significativamente elevados frente a MVP®, Cry1Ac y Dipel®, así como, pero en menor rango, frente a Cry1Ab, Cry1Fa y Cry1Ca, tomando como referencia la cepa susceptible LAB-UK (Tabla 5). Genéticamente presentó una herencia de la resistencia autosómica recesiva frente Cry1Ac, además de estar controlada por un único locus (Sayyed *et al.*, 2004).



**Cry1Ab-SEL:** esta cepa procede de la población SERD4, recolectada en la zona de Serdang (Malasia) en diciembre de 1998 (Fig. 24). Originariamente presentaba altos niveles de resistencia a Cry1Ac y Cry1Ab (Sayyed y Wright, 2001). Mediante estudios posteriores con esta cepa se observó que la resistencia a Cry1Ab (Tabla 5) era multigénica y que se heredaba de forma parcialmente dominante e influenciada por el sexo (Sayyed *et al.*, 2005). Además, también se observó que Cry1Ab-SEL era más susceptible a la toxina Cry1Ab activada que a la protoxina, por lo que cabía esperar que una alteración en el paso de activación de las toxinas pudiera estar involucrado en el fenotipo resistente, aunque no se observó ningún defecto en este punto (Sayyed *et al.*, 2005).

**Kluang:** el origen de esta población de insectos se sitúa en las regiones bajas de la zona de Kluang en Malasia, de donde se recolectó a partir de plantaciones de col china (*Brassica pekinensis*) en agosto de 2002, a 240 km del sur de Serdang (Fig. 24). En esta zona también se aplicaron, durante años, productos Bt como Dipel®. Se observó que su resistencia a Cry1Ac era multigénica, autosómica y de dominancia incompleta (Tabla 5) (Sayyed, 2003, datos no publicados).

**TABLA 5. Toxicidad de diferentes proteínas Cry en las cepas resistentes Karak (Sayyed *et al.*, 2004), Cry1Ab-SEL (Sayyed *et al.*, 2004) y Kluang (Sayyed, 2003) de *P. xylostella*.** El índice de resistencia relativa (RR) se obtiene con el cociente entre el valor de CL<sub>50</sub> de la cepa resistente y el de la cepa susceptible LAB-UK. Los valores se expresan en µg/ml. (-): no determinado

Proteína Cry	Karak		Cry1Ab-SEL		Kluang	
	CL <sub>50</sub> (LF <sub>95</sub> )	RR	CL <sub>50</sub> (LF <sub>95</sub> )	RR	CL <sub>50</sub> (LF <sub>95</sub> )	RR
Dipel®	2.97 (2.18 - 4.15)	770	-	-	-	-
MVP®	9800 (7500 - 13600)	363000	-	-	-	-
Cry1Aa	32.9 (24.2 - 45.8)	845	17.6 (11.08 - 35.65)	440	12.40 (9.1 - 17.62)	310
Cry1Ab	77.0 (57.9 - 110)	164	14.73 (12.60 - 17.64)	2455	17.59 (11.83 - 25.95)	195
Cry1Ac	75.8 (21.7 - 5560)	>5710	22.27 (14.69 - 40.26)	1114	20.79 (12.94 - 38.74)	1040
Cry1Ca	4.15 (2.87 - 5.70)	59	0.14 (0.07 - 0.28)	5	0.37 (0.13 - 0.72)	10
Cry1Fa	82.7 (67.2 - 103)	414	-	-	-	-
Cry1Ja	0.84 (0.59 - 1.25)	27	-	-	-	-



**FIGURA 24.** Origen de las diferentes cepas de *P. xylostella* empleadas en la presente tesis. En el caso de la cepa LAB-PS se indican dos procedencias debido a que aunque fue originaria de Hawai fue posteriormente mantenida en EEUU durante más de 200 generaciones bajo condiciones de laboratorio.

La cría de la cepa susceptible LAB-PS y de la resistente SEL-B se realizaba en una cámara con control de humedad, temperatura y fotoperíodo bajo unas condiciones de 80 %, 25 °C y 16:8 h (luz:oscuridad), respectivamente. Bajo estas condiciones el ciclo biológico de *P. xylostella* se completaba en unos 20-25 días.

Los adultos eran mantenidos en jaulas fabricadas con una estructura de madera y recubiertas por una tela porosa, en cuyo interior se colocaban hojas de col china frescas (variedad *Brassica rapa* subsp. *chinensis* sin tratamientos insecticidas en invernadero) en contacto con agua y entremezcladas con tiras de Parafilm®. En estas tiras de plástico las hembras adultas ovipositaban atraídas por las hojas de col, de forma que se facilitaba la recogida de los huevos. Los adultos eran alimentados con una disolución de agua con miel. A los dos tres días de la puesta, los huevos se recogían y se colocaban entremezclados de nuevo entre hojas de col (en contacto con agua) en el

interior de cajas de metacrilato. Así al eclosionar los huevos las larvas se iban alimentando de la hoja en la que estaban en contacto. Cada tres días las hojas debían de ser sustituidas por frescas para que las larvas continuaran su proceso de desarrollo hasta la fase de pupa y adulto. Los adultos, de nuevo, eran devueltos a la jaula una vez recogidos con un aspirador especial. Durante este proceso era importante guardar a 4 °C parte de las tiras de Parafilm® con huevos aún sin eclosionar para asegurar la continuación de la colonia en caso de que por cualquier circunstancia (avería en la cámara, alta mortalidad de individuos, etc.) se perdiera la población.

## 1.2 Cepas de *B. mori*

El estudio con *B. mori* se llevó a cabo en tres cepas diferentes cedidas por el Dr. Sato desde el *Graduate School of Bio-Applications and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology* (Tokyo, Japón). Dos de estas cepas, J65 y Kin, eran susceptibles a Cry1Ab y la restante, C7, era tolerante a esta misma toxina. J65 era una cepa japonesa y C7 china, ambas procedentes del National Institute of Agrobiological Sciences Genebank (Tsukuba, Japón). La cepa Kin era una raza híbrida comercial (Kinshu X Showa) procedente de Ueda-Sanshu Co. (Ueda, Japón).

Los valores de CL<sub>50</sub> de la toxina Cry1Ab, para cada una de las cepas de estudio, mostraban que las cepas J65 y Kin eran significativamente más susceptibles que la cepa C7 (**Tabla 6**).

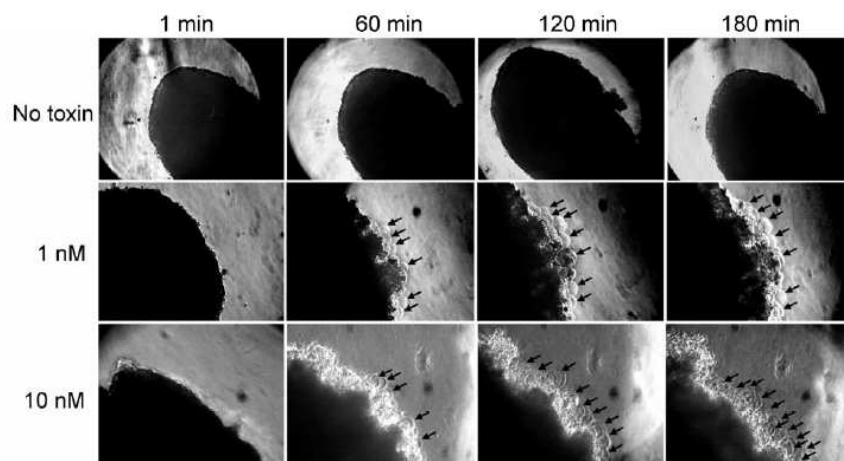
**TABLA 6. Susceptibilidad frente la protoxina Cry1Ab de larvas de segundo estadio de las cepas J65, Kin y C7 de *B. mori*.** Las unidades en las que se mide la CL<sub>50</sub> son en µg/g de dieta artificial.

Cepa <i>B. mori</i>	CL <sub>50</sub> (LF <sub>95</sub> )	Pendiente
J65	0.84 (0.15 – 1.54)	1.41
Kin	5.04 (3.89 – 6.55)	2.65
C7	> 10000	

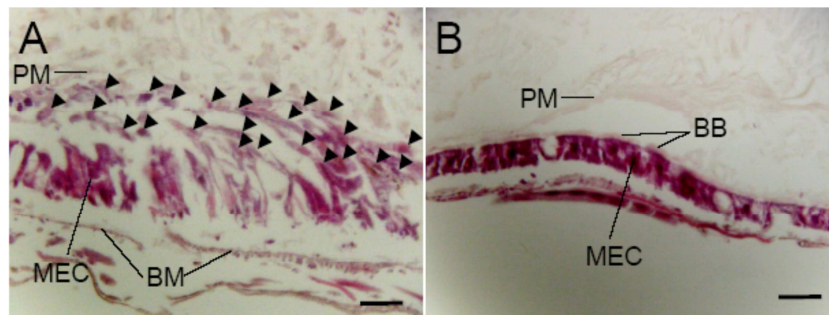
En el caso concreto de la cepa J65 se llevaron a cabo otros ensayos de toxicidad mediante hojas de morera impregnadas con las protoxinas Cry1Aa y Cry1Ab. Estos datos mostraban que la cepa J65 era susceptible frente a las toxinas Cry1Aa y también Cry1Ab con unas toxicidades muy similares, aunque con pendientes de los bioensayos significativamente diferentes ( $p < 0.05$ , t-test), siendo la respuesta de esta cepa frente a concentraciones crecientes de Cry1Aa más rápida que frente (Ibiza-Palacios *et al.*, 2008). La elección de la cepa J65 para el análisis del modelo de receptores en *B. mori* se basó en los datos de toxicidad (Tabla 7) obtenidos por el grupo del Dr. Sato (grupo con el que se colaboró en el presente trabajo), así como en la cinética de unión que mostraba. La toxicidad de Cry1Ab fue comprobada al observar como las células del intestino medio sufrían un proceso de lisis osmótica al ser incubadas *in vitro* con Cry1Ab (Fig. 25) (Ibiza-Palacios *et al.*, 2008). De la misma manera el efecto de esta toxina se pudo observar a través de cortes histológicos del epitelio intestinal tras la ingestión de la toxina por larvas de la cepa J65 y la tolerante C7 observando una clara diferencia entre el estado final del tejido epitelial (Fig. 26).

**TABLA 7. Susceptibilidad de la cepa J65 de *B. mori* a las protoxinas Cry1Aa y Cry1Ab.** Los valores de CL<sub>50</sub> se muestran en µg de proteína/cm<sup>2</sup> de hoja de morera y proceden de la media de 3 réplicas.

Protoxina	CL <sub>50</sub> (LF <sub>95</sub> )	Pendiente
Cry1Aa	0.035 (0.023 – 0.046)	7.2 ± 1.7
Cry1Ab	0.034 (0.005 – 0.266)	2.0 ± 0.3



**FIGURA 25. Susceptibilidad de las células epiteliales del intestino medio de la cepa J65 a la toxina Cry1Ab.** Se emplearon distintas concentraciones de Cry1Ab (0, 1 y 10 nM) y el proceso se observó bajo microscopía de contraste de fases a diferentes tiempos (1, 60, 120 y 180 min). Las flechas indican la lisis de las células en respuesta a la unión de Cry1Ab.



**FIGURA 26.** Comparación de cortes histológicos del intestino medio de larvas de la cepa susceptible J65 (A) y de la tolerante C7 (B) de *B. mori* tras 1h de la ingestión de la protoxina Cry1Ab. Las larvas de ensayo de segundo estadio fueron alimentadas con 1 (A) y 1000 μg Cry1Ab/g dieta (B). Las flechas indican las células del epitelio afectadas. BB: borde en cepillo; BM: membrana basal; MEC: células del epitelio intestinal del intestino medio; PM: membrana peritrófica. La barra presenta 50 μm.

## 2. PROTEÍNAS Cry EMPLEADAS

En la **tabla 8** se muestran las proteínas Cry empleadas en los ensayos llevados a cabo en la presente tesis. En función del microorganismo de procedencia su obtención se lleva a cabo por diferentes protocolos que se detallan en los siguientes apartados.

**TABLA 8.** Descripción de las cepas empleadas de *B. thuringiensis* y de *E. coli*

Proteína Cry	Cepa de origen	Recombinante	Resistencia al antibiótico	Cedida por:
Cry1Ab	EG7077	<i>B. thuringiensis</i>	Tetraciclina	Ecogen Inc. Langhorne, PA.
	GG094-208	<i>E. coli</i>	Ampicilina	Plant Research International B.V. Wageningen, Netherlands
Cry1Ac	EG11070	<i>B. thuringiensis</i>	Cloranfenicol	Ecogen Inc. Langhorne, PA
Cry1Ca		<i>E. coli</i>	Ampicilina	Plant Research International B.V. Wageningen, Netherlands
Cry1F	EG11079	<i>B. thuringiensis</i>	Cloranfenicol	Ecogen Inc. Langhorne, PA

### 2.1 Preparación de proteínas Cry a partir de cepas de *B. thuringiensis*

El esquema general se componía de diferentes fases: crecimiento en placa, precultivo líquido y cultivo líquido final. Al finalizar el último paso se llevaba a cabo el proceso de solubilización de los cristales y activación de las toxinas Cry. El método empleado fue descrito por Stewart *et al.* (1981).

En primer lugar la cepa seleccionada para la obtención de la toxina Cry deseada, era crecida en una placa Petri con medio CCY (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13 mM,



$K_2HPO_4$  26 mM, 20 mg/l L-glutamina, 1 g/l caseína, 1 g/l triptona, 0,4 g/l extracto de levadura, 0.36 % glicerol; con la adición de sales minerales para facilitar la esporulación ( $ZnCl_2$  50 mM,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  500 mM,  $MnCl_2 \cdot 6H_2O$  10 mM,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  200 mM,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  50 mM) que fue suplementado con 10  $\mu$ g/ml del antibiótico tetraciclina en el caso de la cepa EG7077 y 30  $\mu$ g/ml de cloranfenicol para el resto de cepas. Se incubaba a 29 °C durante 48h, tras lo cual se realizaba un precultivo en 20 ml de medio CCY líquido con la siembra de una colonia. Transcurrida este tiempo de incubación se comprobaba la esporulación del cultivo mediante la visualización de una muestra bajo en microscopio óptico de contraste de fases. Tras comprobar la adecuada esporulación del precultivo (más del 90% de células esporuladas) se sincronizaba a 70 °C durante 30 min. Posteriormente, se tomaba una alícuota del precultivo y se sembraba en 3 l de medio líquido CCY y se incubaba durante 72 h a 29 °C en agitación suave. Durante el proceso se controlaba la calidad y cantidad de la esporulación del medio. Una vez el cultivo estaba totalmente esporulado se centrifugaba a 15000 g a 4 °C durante 12 min para recoger el precipitado en el que se encontraban las esporas y los cristales producidos.

El precipitado era resuspendido con una solución tamponada fría de 1 M NaCl/5 mM EDTA y centrifugado de nuevo. Este lavado era ejecutado dos veces. El precipitado final era resuspendido con una solución alcalina [50 mM  $Na_2CO_3$  pH 10.5 con 10 mM 1,4-ditiotreitol (DTT)] para la solubilización de los cristales. Esta suspensión era incubada a temperatura ambiente durante 1h en agitación para ser posteriormente centrifugada de nuevo a 23700 g durante 12 min. El sobrenadante, ya con el cristal solubilizado, se cuantificaba mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Finalmente, se llevaba a cabo el proceso de activación de los cristales a través de la adición de tripsina en relación 1:10 (tripsina:protoxina) y un tiempo de incubación de 2h a 37 °C en agitación suave. Todo el conjunto se centrifugaba a 4 °C a 23700 g durante 12 min y se tomaba el sobrenadante para ser

cuantificado por el método de Bradford (1976). La pureza de la toxina activa fue analizada mediante la realización de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE). La toxina activa se guardada a -20 °C hasta su uso.

## **2.2 Preparación de la toxina Cry1Ab y Cry1Ca a partir de *E. coli***

En este caso las protoxinas Cry se encontraban en cuerpos de inclusión en el interior de las células bacterianas de *E. coli*. Este procedimiento es parecido al del apartado anterior, con la salvedad de que en este caso se incluye un proceso de purificación de las protoxinas que forman estos cuerpos de inclusión.

El procedimiento está formado por una primera fase de crecimiento en placa y precultivo líquido, para lo que se utilizaba el medio Terrific Broth (TB) (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 72 mM, 10.8 g/l triptona, 21.6 g/l extracto de levadura, glicerol 0.36 %) suplementado con un 2 % de glucosa y ampicilina (50 µg/ml). El crecimiento en placa se hacía durante 24 h a 37 °C. El precultivo líquido, de unos 20 ml, se realizaba inoculando una colonia del cultivo en placa. La incubación se realizaba en agitación 24 h a 37 °C.

La segunda fase constaba de un cultivo final líquido del que se obtenía la biomasa bacteriana. Para este cultivo final se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, ampicilina 50 µg/ml) con la inoculación de 1 ml del precultivo. Se incubaba con agitación suave, a una temperatura de 37 °C durante 24 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugaba empleando una velocidad de 15000 g a 4 °C 15 min para recoger la biomasa final.

El proceso de purificación de los cuerpos de inclusión se dividía en dos pasos, la lisis celular y los lavados. De esta forma, la biomasa recogida era congelada al menos durante 20 min a -20 °C y resuspendida con el tampón de lisis

(Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM). Una vez resuspendido, se le añadía lisozima (25 µg/ml) para facilitar la rotura de la pared bacteriana. Se incubaba a temperatura ambiente en agitación constante durante 20 min. Tras el tratamiento de lisis, la protoxina, que se encontraba en forma de cuerpos de inclusión en el citoplasma de la célula bacteriana, era liberada al medio. A continuación, se añadían 4 mg de ácido deoxicólico por cada gramo de precipitado y se incubaba en agitación a 37 °C durante 10 min. Pasado este tiempo se añadía DNasa (1 mg/ml) y se incubaba a 37 °C en agitación durante 30 min. Después, se centrifugaba a 15000 g a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante era descartado y el sedimento se resuspendía empleando el tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, Triton X-100 1%, NaCl 1 M) la suspensión se centrifugaba a 15 000 g a 4 °C durante 10 min. Este proceso era repetido dos veces. El último lavado se realizaba empleando PBS 1% (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM pH 7.4) y se centrifugaba a 15000 g a 4 °C durante 10 min.

El proceso de solubilización se realizó mediante la resuspensión del precipitado con 5 ml de tampón de solubilización (Tris HCl 50 mM pH 10, NaCl 100 mM, DTT 10 mM). Se incubaba al menos durante 2 h a temperatura ambiente en agitación lenta. Posteriormente, se centrifugaba a 15000 rpm a 4 °C durante 15 min. Se tomaba el sobrenadante y se cuantificaba por el método de Bradford (1976).

Para el proceso de activación se añadía tripsina (Sigma) al sobrenadante obtenido en relación 1:10 (tripsina:protoxina). Se incubaba 1 h a 37 °C y se centrifugaba a 14000 rpm a 4 °C durante 10 min. Se tomaba el sobrenadante y se cuantificaba por el método de Bradford (1976). La pureza de la toxina activa fue analizada mediante la realización de un gel desnaturante de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE). La toxina activa se guardada a -20 °C hasta su uso.

### 3. BIOENSAYOS DE SELECCIÓN Y TOXICIDAD

Los bioensayos para la selección de la colonia de *P. xylostella*, se realizaban con la preparación de diez discos de hojas de col de 6 cm de diámetro que se sumergían, uno por uno, durante unos 5 s en una disolución de la toxina Cry de ensayo disuelta en 5 ml de agua destilada con 0.2 % de Tritón X-100. En el caso de los bioensayos de toxicidad, se preparaban diferentes concentraciones de la toxina Cry de estudio en un volumen final de 1 ml de agua destilada con 0.2 % de Tritón X-100. Así pues, para el cálculo de la CL<sub>50</sub> en la cepa SEL-B se prepararon una serie de concentraciones de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa, comprendidas entre 1-500 µg/ml, entre 1-100 µg/ml y entre 1-50 µg/ml, respectivamente.

En ambos tipos de bioensayos cada uno de los discos de col se dejaba secar al aire durante unas 2 h hasta ser depositados en placas Petri. Se colocaban 20 larvas (de tercer estadio) de *P. xylostella* por cada placa. En los procesos de selección se preparaban una media de 15 réplicas, en el caso de los bioensayos de toxicidad se preparaban al menos tres réplicas por concentración (Tabashnik, 1987).

El control positivo se basaba en poner en contacto larvas de la cepa susceptible (LAB-PS) con discos de col impregnados con la toxina Cry de estudio; el control negativo se preparaba poniendo en contacto larvas de la cepa resistente con discos de col impregnados solamente con una disolución de agua destilada y 0.2 % de Tritón X-100.

Los resultados de mortalidad de los bioensayos se obtenían tras unos 3 días de incubación bajo las condiciones de mantenimiento de las colonias de *P. xylostella*.

#### **4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RESISTENCIA EN CEPAS DE *P. xylostella* A TOXINAS Cry DE *B. thuringiensis***

##### **4.1 Realización de cruces en masa**

El objetivo de la realización de cruces en masa, era el de caracterizar genéticamente la cepa resistente SEL-B, estimando el tipo el grado de dominancia, así como investigando la existencia o no, de una herencia de la resistencia ligada al sexo.

Para la realización de los cruces se tomaban de las colonias pupas mediante de la ayuda de un pincel o de pinzas de punta fina. Estas pupas se colocaban individualmente en pequeños tubitos de cristal sellados con algodón. El objetivo de este sistema era el poder separar los individuos de sexo diferente y asegurarse que las hembras eran vírgenes. Una vez los individuos emergían de las pupas se procedía a la identificación del sexo. Los machos presentan al final del abdomen una pequeña línea negra que los diferencia de las hembras, además los machos son de menor tamaño.

En el momento de realizar los cruces se preparaban previamente, pequeños recipientes de plástico con tapa, a los que se les añadía un pequeño trozo de Parafilm<sup>®</sup> para que las hembras ovipositaran. También se colocaba un algodoncillo impregnado de agua miel para su alimentación. Una vez preparados estos recipientes de ensayo, se procedía a dormir con CO<sub>2</sub> cada los ejemplares elegidos para la realización del cruce. Una vez dormidos se colocaban 30 individuos de cada sexo en cada uno de los recipientes y se dejaban en la cámara de incubación hasta que las hembras realizaran la puesta. La recogida de los huevos no debía demorarse mucho pues había la posibilidad de que los huevos eclosionaran, emergiendo larvas que por inanición estaban destinadas a morir. Así pues, diariamente se tomaban los trozos de Parafilm<sup>®</sup> y se colocaban en hojas de col para que en el momento de

la eclosión las larvas pudieran alimentarse. Una vez las larvas alcanzaban el tercer estadio eran recogidas para la realización de los bioensayos.

#### **4.2 Ensayos de toxicidad**

El rango de concentraciones empleadas para los bioensayos con la cepa SEL-B estaba comprendido entre 5 y 300  $\mu\text{g/ml}$ , entre 5 y 80  $\mu\text{g/ml}$  y entre 5 y 50  $\mu\text{g/ml}$  para Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa, respectivamente. Se realizaron dos réplicas, de 20 larvas por placa, por cada una de las concentraciones de estudio. Los individuos para los cruces se tomaron de la generación F68.

#### **4.3 Dominancia**

La herencia de la resistencia para un nivel de mortalidad del 50 % ( $D_{CL}$ ) se determinó de acuerdo con el método de Bourguet *et al.* (2000). Mediante este procedimiento se determina el rango de 0, resistencia completamente recesiva, a 1, resistencia completamente dominante.

#### **4.4 Tratamiento informático de los resultados**

Los datos se procesaron mediante un análisis Probit (Finney, 1972) empleando el programa informático POLO-PC (Russell *et al.*, 1977). Cuando las rectas Probit de las poblaciones no eran paralelas se comparaban las  $CL_{50}$  mediante el ratio de las mismas (Robertson y Presisler, 1991). De esta manera, los valores de  $CL_{50}$  fueron considerados significativamente diferentes cuando los límites de confianza  $LC_{95}$ , que se obtenían del análisis Probit, no se solapaban. Cuando había paralelismo se utilizó el dato de potencia relativa de la  $CL_{50}$  que suministraba el programa POLO-PC (Russell *et al.*, 1977).

## 5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS AMINOPEPTIDASAS, CADERINA Y OTROS MARCADORES MOLECULARES

### 5.1 Diseño de los cebadores

El diseño de los cebadores fue realizado mediante las secuencias de ADNc de estudio con la ayuda del programa informático Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Posteriormente, fueron analizados para comprobar la formación de estructuras secundarias o de dímeros con el programa Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx>).

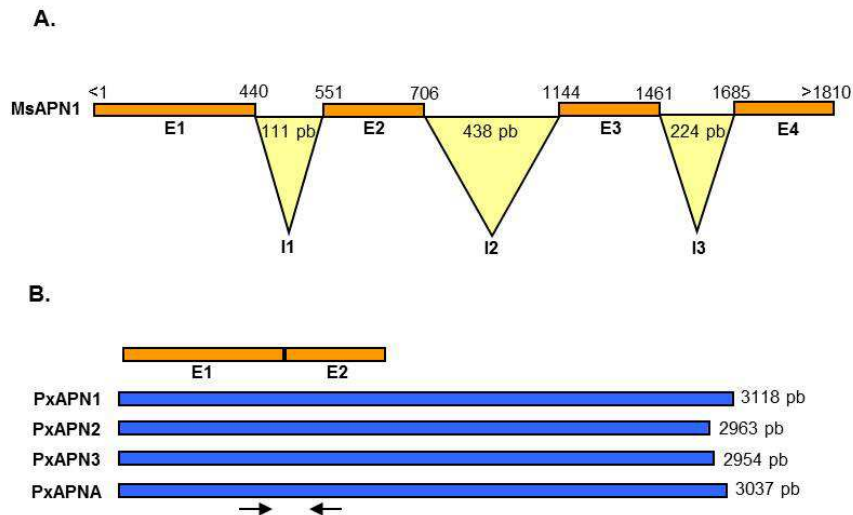
Los cebadores utilizados para la amplificación de las aminopeptidasas se muestran en la **tabla 9** y **tabla 10**.

#### 5.1.1 Aminopeptidasas N

##### 5.1.1.1 Aminopeptidasas N en *P. xylostella*

Las cuatro aminopeptidasas de ADNc descritas en *P. xylostella* denominadas como PxAPN1 (X97878) (Denolf *et al.*, 1997), PxAPN2 (AJ222699), PxAPN3 (AF109692) (Nakanishi *et al.*, 2002) y PxAPNA (AF020389) (Chang *et al.*, 1999) fueron alineadas con la secuencia genómica de la APN1 del lepidóptero *M. sexta* (AB007039) (Hua *et al.*, 1998), concretamente con el primer y segundo exón (**Fig. 27**).

De este alineamiento se diseñaron diferentes cebadores (**Tabla 9**) que pudieran amplificar parte de los dos exones y todo el intrón.



**FIGURA 27. Estrategia seguida para la amplificación del intrón 1 (I1) de MsAPN1 en cada una de las aminopeptidasas descritas en *P. xylostella*.** (A) Estructura genómica parcial APN1 de *M. sexta* MsAPN1 (AB007039) tomada como secuencia de referencia. (B) Partiendo de la suposición de que las aminopeptidasas N de *M. sexta* y *P. xylostella* podrían compartir la misma estructura genómica, se tomaron los dos primeros exones (E1 y E2) descritos en la MsAPN1 y se alinearon con las secuencias de ADNc de *P. xylostella* PxAPN1 (X97878), PxAPN2 (AJ222699), PxAPN3 (AF109692) y PxAPNA (AF020389). Tras el alineamiento se diseñaron los cebadores (se indican con flechas) justo en la zona donde podría situarse el posible primer intrón.

Es importante hacer mención del caso de la amplificación de la PxAPN3 pues resultó ser particular debido a que con los cebadores diseñados a partir de la PxAPN3 publicada (AF109692) no se obtuvo amplificado alguno, a pesar de probar distintas estrategias como el diseño de nuevos cebadores, variación de los componentes de reacción, realización de PCR en gradiente, etc. Esta misma situación coincidía con los resultados de cartografiado de las aminopeptidasas de *P. xylostella* de Baxter *et al.* (2008). Este grupo menciona en su trabajo la dificultad de asignar la PxAPN3 a ningún grupo de ligamiento pues fueron incapaces de poder amplificarla por PCR. Los autores apuntan, como explicación la posible, la presencia de un intrón de gran tamaño que estaría impidiendo la completa amplificación de la secuencia.



Por todo ello, se cambió de estrategia y se tomaron como secuencias de partida para el diseño de cebadores otras APN3 publicadas en otros lepidópteros plaga, en concreto, la BmAPN3 y la HaAPN3 de *B. mori* (AF352574) (Nakanishi *et al.*, 2002) y *H. armigera* (AY052651), respectivamente. La elección de estas dos especies de insectos fue debido a que en aquel momento se disponía de diferentes colonias de estas especies de insectos en el laboratorio. Con el alineamiento de ambas secuencias, BmAPN3 y HaAPN3, se diseñaron cebadores degenerados situados alrededor de la zona donde existía la posibilidad de situarse unos de los intrones, en caso de compartir la misma estructura genómica con la MsAPN1 (Fig. 27). Para evitar la presencia de amplificaciones inespecíficas por el uso de cebadores degenerados, se diseñaron nuevos cebadores específicos (Tabla 9) a partir de los resultados de secuenciación.

**TABLA 9. Cebadores empleados para la amplificación de las aminopeptidasas en *P. xylostella*. (\*): cebadores diseñados a partir de la secuencia de PxAPN3 KC767737**

Aminopeptidasa N (nº acceso GenBank)	Nombre	Secuencia 5' → 3'	Posición 5'
<b>PxAPN1</b> (X97878)	PxAPN1-L	AAGAGTCGTGCCAGAAATTG	252
	PxAPN1-R	TGGCTGCAGTGCATCTAAAA	667
<b>PxAPN2</b> (AJ222699)	PxAPN2-L	TGAAATTACACCGCACTTCG	180
	PxAPN2-R	CAAAGGGTGATGATGGGTTT	357
<b>PxAPN3</b> (AF109692) (*KC767737)	PxAPN3-L	TGGGATGTACTCTGGCTGAA	985
	PxAPN3-R	AAGGTGATGGGGATGACGTA	1528
	PxAPN3-deg-L	GGATGGCIWCNACNCAGT	386
	PxAPN3-deg-R	DCCCCARTTITCCATAGC	832
	*PxAPN3-esp-L	TTGCCTTCCCTTGCTACG	6
	*PxAPN3-esp-R	AGAAATCAAGACCCGTGTGG	346
<b>PxAPNA</b> (AF020389)	PxAPNA-L	CCGTCTGGCATAACACCATT	216
	PxAPNA-R	ACGAAATGGTCCGCCTAATA	689

### 5.1.1.2 Aminopeptidasas N en otras especies de lepidópteros

Las aminopeptidasas APN1 y APN3 fueron amplificadas en los lepidópteros *H. armigera* y *B. mori*. Las regiones que fueron amplificadas en la HaAPN1 (AY358034) y la BmAPN (AB007038) (Hua *et al.*, 1998b) eran las que alineaban con los dos primeros exones de la secuencia genómica de *M. sexta* MsAPN1 (Hua *et al.*, 1998) con el fin de situar el posible primer intrón (Tabla 10). Para la amplificación de las aminopeptidasas N HaAPN3 (AY052651) y BmAPN3 (AF352574) (Nakanishi *et al.*, 2002) también se tomó como secuencia modelo la aminopeptidasa MsAPN1 pero los cebadores fueron diseñados aguas abajo de la región hasta ahora analizada (Tabla 10).

**TABLA 10. Cebadores empleados para la amplificación de las secuencias de aminopeptidasas N en *H. armigera* y *B. mori***

Aminopeptidasa N (nº acceso GenBank)	Nombre	Secuencia 5' → 3'	Posición 5'
<b>HaAPN1</b> (AY358034)	HaAPN1-L	ATAAGGACCGCAGGAGCAT	373
	HaAPN1-R	AGTCGGCTCCCTGTTGAT	613
<b>HaAPN3</b> (AY052651)	HaAPN3-L	GGATGGCAACGACTCAGT	613
	HaAPN3-R	GCCCAGTTTTCCATAGC	1056
<b>BmAPN</b> (AB007038)	BmAPN-L	GACTTTCGCCTGTGAGATGC	381
	BmAPN-R	TTTCAGAAACGCGACCATTT	724
<b>BmAPN3</b> (AF352574)	BmAPN3-L	GGATGGCCTCTACACAGT	596
	BmAPN3-R	ACCCAATTTTCCATAGC	1050

### 5.1.2 Caderina

Para la amplificación de la caderina en *P. xylostella* se diseñaron los cebadores Cad-L (5'-GCGTCAAAATCGAAACCAT-3') y Cad-R (5'-CGGACAAGTACAGGACCTCAA-3') a partir de la secuencia (AY564235) publicada por el grupo de Yang *et al.* (2009).

### 5.1.3 Marcador molecular STS

Los primeros cebadores para su amplificación fueron los publicados por Heckel *et al.* (1999) llamados P1-L y P2-R. La segunda pareja de cebadores empleada fue diseñada a partir de la secuencia STS publicada (AF149306) en el anterior trabajo del grupo del Dr. Heckel, fueron los denominados Heckel-L y Heckel-R (Tabla 11-Fig. 28).

Debido a la ausencia de resultados positivos, tal como se verá en el apartado 2.1.3 de Resultados, se llevó a cabo otra estrategia de diseño de cebadores basado en la presencia de cambios nucleotídicos (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*). Para ello, se alinearon las secuencias de los amplificadores del STS obtenidos hasta el momento y se delimitaron las zonas con presencia de SNP, donde se diseñó el cebador HPol2-L. Este cebador junto con el cebador P2-R fueron los finalmente empleados (Tabla 11-Fig. 28).

**TABLA 11. Cebadores empleados para la amplificación del marcador molecular STS en *P. xylostella***

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Posición 5'
P1-L	CCGTGCTGAGCATTGGACAGTGAG	451
P2-R	TTAACTATATTGTTGGTGACGATAAGGTG	747
Heckel-L	GACGGAGCTCGGAGTCACTA	75
Heckel-R	CAACTGACACTTGGGCACAT	544
HPol-L	ATGTAGGTATAAGCTCAGATG	383

5'GAATTCAAAAACTTTTAGATCATACAAATAATTATAAAAAGACACATTATAAAACAT  
 ACATTTTTATATAACATGACGGAGCTCGGAGTCACTACCACACTGCATTGATATTTTT  
 TGTCTGTTCTCTCGTGGCTAGAAATAAAAACAATAGAGGCGAAAGTATATCAAAATAAA  
 ATAAACTGTAACAAAAACAATCGAACAAACTATCTCAACTAAGACATTATTGAGCA  
 ACGCCTGTCCTACATCAGTAAACATCTTGTGTAGATACCTATCTATTTCTCGGTATAGT  
 CAAGCCGAGCGTCACAAACTGACCTTCTAGCCTTATCTCATGAGACATAAGATTGAGAT  
 TCCAGTAGCACTAATGTCTAATCTCGTTATTTGTAGGTATAGGCTCACATATACATAAT  
 ATTATAGGTACTAGCTATAGTGTATTGTATCATTGTATCCCGTGCTGAGCATTGGACAG  
 TGAGTGACGAAGGCAAGAGCTATTAGATTACTAGACAATAGGCTGGTTAGCAATTATA  
 ATTATACATAGCGGGATGTGCCCAAGTGTCAAGTTGTAAGCAGTGGGCTTACCGGCTGG  
 AATGTGCTTTATTTGTTTATTTTTGGTGGGATAGAAGGGGGAGGGTATGAAGTTTTTCC  
 GAAAATTCATATTTTTATTGAAGACTTCGGTGTAGGATATAGGTATTATTTGTAAGAGA  
 ATGACATATTGTAATTCACTGTATACTAACTTATATATCGTCACCTTATCGTCACCAA  
 CAAATATAGTTAA3'

**FIGURA 28. Representación de la posición de cada uno de los cebadores empleados para la amplificación del fragmento STS.** Los cebadores P1-L y P2-R se representan en rosa, los Heckel-L y -R en verde y el HPol-L en azul y en rojo los SNP.

## 5.2 Extracción ADN genómico

La extracción del ADN genómico de *P. xylostella*, así como de *Helicoverpa armigera* y *B. mori*, se hizo a partir de insectos adultos individuales mediante la homogeneización mecánica con la solución PrepMan™ Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los inhibidores de la PCR fueron eliminados mediante la precipitación de los ácidos nucleicos con 0.1 volúmenes de 3 M de acetato de sodio y un volumen de isopropanol. La cuantificación del ADN genómico fue llevada a cabo mediante una electroforesis con un gel de agarosa al 1 % con tampón TBE (0.45 M Tris-HCl; 0.45 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0.01 M EDTA) teñido con bromuro de etidio. La concentración de ADN genómico fue estimada mediante la comparación con el marcador de pesos moleculares DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1 kpb) (Roche, Penzberg, Alemania).

## 5.3 Reacción en cadena de la polimerasa

### 5.3.1 Amplificación de las aminopeptidasas

Las reacciones de PCR se componían de una mezcla de 25 ng de ADN genómico, tampón 1× PCR Expand™ High Fidelity PCR (Roche), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM de cada uno de los dNTP, 320 nM de cada cebador y 1.4 unidades de la enzima ADN polimerasa Expand™ High Fidelity PCR system Taq (Roche), todo ello llevado en un volumen final de 25 μl. Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas con el termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94 °C durante 1 min, seguido por 10 ciclos de 94 °C durante 15 s, 45 °C 30 s y 72 °C durante 5 min. Los siguientes 20 ciclos fueron de 94 °C durante 15s, 55 °C 30s, 72 °C 5 min (con un ciclo de elongación de 5 s por cada ciclo) y 7 min a 72 °C.

En el caso de la amplificación de la PxAPN3 mediante cebadores degenerados se preparó la misma mezcla de reacción indicada anteriormente aumentando la concentración de los cebadores a 960 nM. Las condiciones de PCR empleadas fueron de: 94 °C durante 5 min, seguido por de un preciclo constituido por 5 ciclos de 94 °C durante 1 min, 37 °C 1 min y 72 °C 2 min. A continuación, se añadían 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 2 min, tras los que se finalizaba con 5 min a 72 °C. Estas condiciones, tras la prueba de otras diferentes mediante PCR en gradiente, permitieron una mejor unión de los cebadores degenerados diseñados y una disminución de amplificaciones inespecíficas.

### 5.3.2 Amplificación de la caderina y digestión mediante enzimas de restricción

La reacción de PCR presentaba los mismos componentes que el indicado para las aminopeptidasas (5.3.1). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94 °C durante 5 min seguido por 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 48 °C 1 min

y 72 °C durante 2 min, con una fase última de elongación, tras la finalización de los ciclos, de 5 min a 72 °C. El proceso de digestión de los amplificadores se realizó utilizando 1U del enzima de restricción *Mva*I, el tampón específico 1x y aproximadamente 5 µg de ADN total. La reacción se incubó a 37 °C durante toda la noche.

### 5.3.3 Amplificación del marcador molecular STS

Las reacciones de PCR fueron llevadas en un volumen final de 20 µl que consistía en una mezcla de 25 ng de ADN molde, 75 mM Tris HCl (pH 9), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>2</sub>, 0.0001% BSA, 100 µM de cada uno de los dNTP, 2.5 µM de cada cebador y 0.5 unidades de la enzima NETZYME ADN Polimerasa (Molecular Netline Bioproducts-NEED, Valencia, España). Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas con el termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Las condiciones de PCR para la amplificación del marcador molecular STS fueron de: 94 °C durante 5 min seguido por 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 50 °C 1 min y 72 °C durante 2 min, con una fase última de elongación, tras la finalización de los ciclos, de 5 min a 72 °C.

### 5.4 Electroforesis de agarosa y purificación de bandas

De cada una de las reacciones de PCR se tomaban 5 µl de muestra (con 1 µl del indicador azul de bromofenol o xilen cianol) para ser analizados por electroforesis en un 1-2% de gel de agarosa (en función del tamaño del amplificado) preparada con TBE y teñida con bromuro de etidio. El tamaño de las bandas fue estimado con el marcador de pesos moleculares Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania) o pUC19/*Msp*I (*Hpa*II) Marker 23 (Fermentas, GmbH).

Los amplificadores resultantes eran purificados con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche) y secuenciados, en ambas direcciones, en el Servei de Seqüenciació de la Universitat de València. Los cromatogramas, resultado de las secuenciaciones, fueron comprobados mediante el programa informático Sequencher 4.0.5 (Gene Codes Corporation. Inc.)

## 5.5 Análisis de las secuencias

Todos los códigos de acceso de las secuencias presentadas en este trabajo proceden del GenBank. Las búsquedas mediante el BLASTn fueron hechas desde el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Los alineamientos fueron realizados con el programa MultAlin (Corpet, 1998) y los porcentajes de identidad entre secuencias se obtuvieron con el programa Bioedit v 5.0.9 (Hall, 1999). Los puntos de corte de las secuencias amplificadas fueron detectados usando el NNSPLICE v. 0.9 en la web <http://www.bdgp.org> del Berkeley Drosophila Genome Project.

Para traducir las secuencias nucleotídicas, los intrones fueron eliminados y unidos los exones lo cuales fueron, posteriormente, traducidos en los tres marcos de lectura con el JavaScript Translator 1.1 ([http://www.bioinformatics.vg/bioinformatics\\_tools/JVT.shtml](http://www.bioinformatics.vg/bioinformatics_tools/JVT.shtml)). Se eligió el marco de lectura que no generaba codones de parada. La herramienta BLASTp fue utilizada con las secuencias traducidas para averiguar su identidad aminoacídica con las secuencias publicadas. Finalmente, con la herramienta SMART 4.0 (<http://smart.embl-heidelberg.de>) (Schultz *et al.*, 1998) se caracterizaba la función de las secuencias traducidas.

Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo con 72 secuencias APN de diferentes especies de lepidópteros representantes de las familias Plutellidae, Pyralidae, Bombycidae, Lymantriidae, Noctuidae, Sphingidae, Crambidae y Tortricidae. Todas estas secuencias fueron tomadas de las aminopeptidasas

incluidas en el filograma publicado por Crava *et al.* (2010) incluyendo, además las nuevas secuencias parciales de *B. mori* y de *P. xylostella* publicadas en la base de datos GenBank. Las secuencias correspondientes a *B. mori* fueron: BmAPN2 (AFK85018), BmAPN8 (AFK85024), BmAPN9 (AFK85025), BmAPN10 (AFK85026), BmAPN14 (AFK85030) y las secuencias parciales de *P. xylostella*: PxAPN-D2 (ABU55719), PxAPN-G (ABU55720) y PxAPN-E (ABU55722). De *P. xylostella* habían más secuencias publicadas pero, tras un análisis filogenético, se observó que se agrupaban en cada uno de los grupos en los que se encontraban las PxAPN1, PxAPN2, PxAPN3 y PxAPNA, por lo que no se consideraron para su estudio. Únicamente las secuencias PxAPN-D2, PxAPN-G y PxAPN-E se localizaron en grupos filogenéticos distintos, por lo que se incluyeron con el resto de aminopeptidasas para el análisis filogenético.

Para la elaboración del árbol filogenético se empleó el sistema de análisis de secuencias COBALT ([http://www.st-vi.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi?](http://www.st-vi.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi?)) (Papadopoulos y Agarwala, 2007) a través del algoritmo Neighbor-Joining para el cálculo de las distancias evolutivas (Saitou y Nei, 1987). La fracción máxima permitida de bases no alineadas por par de secuencias analizadas fue de 0.9 por lo que el modelo de distancias empleado fue el de Grishin (1995), muy parecido al de Kimura pero que permite una mayor proporción de aminoácidos no apareados. El rango de *bootstrap* se situaba entre 500-1000. Como visor de los árboles filogenéticos se utilizó el programa TreeDyn ([http://www.phylogeny.fr/version2.cgi/one\\_task.cgi?task\\_type=treedyn](http://www.phylogeny.fr/version2.cgi/one_task.cgi?task_type=treedyn)).



## 5.6 Estudios de ligamiento entre marcadores moleculares

### 5.6.1 Elaboración de familias

Con el fin de obtener familias informativas de *P. xylostella* se elaboraron diferentes familias de dos generaciones (generación parental P y filial F1) mediante cruces individuales entre individuos de la cepa susceptible LAB-PS. La forma de realizar los cruces de los parentales siguió la misma metodología que la descrita en el apartado 4.1, solo que en este caso, únicamente se cruzaban entre sí un macho y una hembra, ambos procedentes de la cepa LAB-PS.

### 5.6.2 Tratamiento informático de los resultados

El cálculo del ligamiento entre las diferentes aminopeptidasas y la secuencia STS, mediante el valor de LodScore, fue llevado a cabo mediante el paquete de programas LINKAGE v. 1.77. Para ello, y en primer lugar, fueron genotipados los diferentes alelos de las aminopeptidasas como de la secuencia STS a partir de cada uno de los individuos que formaban las familias, elaborando de esta manera, una matriz en la que se distribuían, en diferentes columnas, cada una de la información requerida.

Los distintos genotipos obtenidos fueron introducidos en un programa de texto con el fin de obtener un archivo que sería analizado con el programa MAKEPED tras el cual se obtuvo el archivo denominado pedfile. Toda la información (número de loci, autosómicos, etc.) de los diferentes loci de estudio, aminopeptidasas y STS, se introdujo en el programa PREPLINK obteniendo un archivo denominado datafile. Ambos tipos de archivos se analizaron con el programa LINKLODS el cual proporcionó los valores de LodScore para diferentes frecuencias de recombinación.

## 5.7 Estudio de complementación genética de la resistencia entre las cepas Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang de *P. xylostella*

El estudio de complementación de los genes implicados en la resistencia frente a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se realizó con las cepas Karak, Kluang y Cry1Ab-SEL y fue llevado a cabo por el Dr. Sayyed. Individuos de estas tres cepas fueron cruzados entre sí y la generación F1 resultante fue sometida, a través de bioensayos, a una dosis discriminante de 10 µg/ml con la que la herencia de la resistencia era de carácter recesivo, tal y como se observa al ser cruzadas con la cepa susceptible LAB-UK (Fig. 29). Solo se pudo disponer de los valores de CL<sub>50</sub> de los ensayos con Cry1Ac (Tabla 12).

En relación a estos ensayos, en la presente tesis también se llevó a cabo el estudio de determinación de ausencia o presencia de complementación pero, en este caso, a nivel del fenotipo de unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac a BBMV de estas mismas cepas (Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang). Para ello, se siguió la metodología descrita en el apartado 6.6 con las toxinas marcadas Cry1Ab-I<sup>125</sup> y Cry1Ac-I<sup>125</sup> y con las BBMV preparadas a partir de la generación filial F1, resultado de los cruces entre las tres cepas.

**TABLA 12. Bioensayos de complementación entre las cepas Karak, Cry1Ab-SEL, Kluang.** Se indica el perfil de resistencia frente a Cry1Ac en las diferentes generaciones F1 resultado del cruce entre estas cepas. El perfil toxicológico de los parentales, así como de la cepa susceptible LAB-UK, se muestran en las tablas 4 y 5. El índice de resistencia relativa (RR) se obtiene del cociente entre el valor de CL<sub>50</sub> de la cepa resistente con el de la cepa susceptible LAB-UK.

Cruce	CL <sub>50</sub> (LF <sub>95</sub> ) (µg/ml)	Pendiente ± SE	RR
Karak x Cry1Ab-SEL	4.39 (1.86 - 7.20)	1.82 ± 0.40	220
Karak x Kluang	3.31 (1.22 - 5.64)	1.83 ± 0.41	166
Cry1Ab-SEL x Kluang	24.33 (16.65 - 35.00)	2.46 ± 0.43	1217

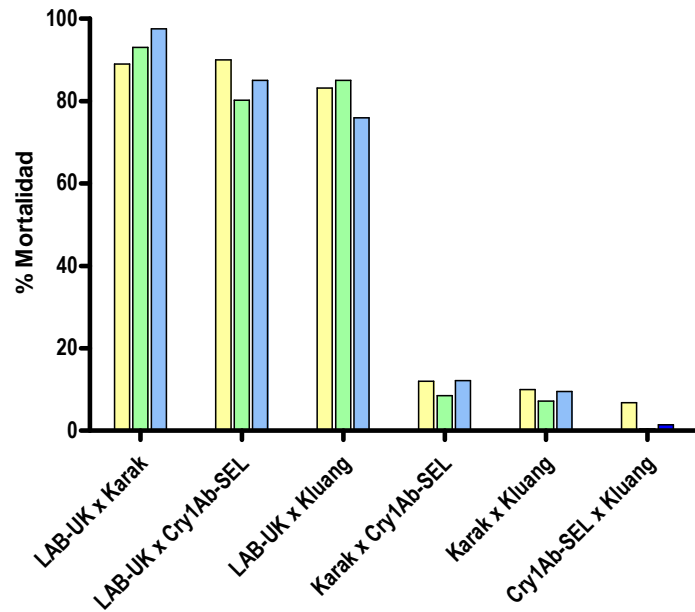


FIGURA 29. Porcentaje de mortalidad de las generaciones F1 de los cruces entre las cepas resistentes Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang con la susceptible LAB-UK de *P. xylostella*, así como entre las resistentes bajo dosis discriminantes de las toxinas Cry1Aa (amarillo), Cry1Ab (verde) y Cry1Ac (azul). Fte.: Gráfico cedido por el Dr. A. Sayyed

## 6. ENSAYOS DE UNIÓN DE LAS TOXINAS Cry CON BBMV

### 6.1 Purificación de las toxinas Cry

En los ensayos de unión se requiere la purificación de las toxinas Cry mediante cromatografía de intercambio aniónico mediante el sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). Este sistema elimina los fragmentos de protoxina que pudieran bloquear el marcaje con  $I^{125}$  y que también podrían interferir en los ensayos de unión. Este proceso de purificación se realizó tras las solubilización y activación de las toxinas Cry según la metodología descrita en el apartado 2. Una vez la toxina Cry activada, se dializaba en 4 l de tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 8.6) durante toda la noche a 4 °C. A continuación, se

filtraba en un filtro estéril de 0.45 µm de poro (Millipore) y se cuantificaba por el método de Bradford (1976). También se filtraban los tampones, el agua MQ y el etanol 20% para evitar la introducción de impurezas en la columna. La toxina Cry así obtenida, se cargaba en una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) para FPLC equilibrada, previamente, con tampón A. Mediante un colector automático (RediFrac de Pharmacia) se recogían las fracciones y se seguía la absorbancia a 280 nm (detector UV-visible L-4250 de Merck). La elución de las toxinas Cry1A ya purificadas se realizó con tampón B (Tris-HCl 20 mM, 1 M NaCl, pH 8.6) alrededor de unos 30 min. La pureza e identidad de las toxinas se determinó mediante electroforesis SDS-PAGE.

## 6.2 Marcaje radiactivo de las toxinas Cry

El marcaje de toxinas se realizó mediante cloramina-T (Sigma) y con el sistema Iodo-Beads® (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill.)

El primero de ellos se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Van Rie *et al.* (1989). La metodología seguida consistió en la preparación de una mezcla de reacción de, aproximadamente, 0.5 mCi NaI<sup>125</sup>, 15 µl de cloramina-T 18 mM (Sigma) y, alrededor de, 25 µg de la toxina Cry a marcar. Esta mezcla de reacción se dejaba reposar durante unos 45 s a temperatura ambiente, sin exceder de este tiempo por peligro de degradación de la toxina Cry. Una vez transcurridos la reacción se paraba con 12 ml de metabisulfito 23 mM a los que se añadían 43.5 µl de NaI 1M como competidor, para evitar que el I<sup>125</sup> que pudiera quedar, continuara reaccionando con la toxina Cry.

Una vez paralizada la reacción ésta se cargaba en una columna de 180 x 17 mm de BioGel P-30 (Bio-Rad), para la eliminación de todo el yodo libre y separación de la toxina Cry marcada. Para ello se utilizó el tampón de elución (20 mM Tris-HCl pH 8.6, 150 mM NaCl, 0.1% BSA).

Las fracciones eluidas se recogían mediante un colector. La radiación emitida de cada una de las fracciones se medía en un contador de radiación gamma Compugamma 1282 (LKB Pharmacia). Tras el conteo los datos se representaban en una gráfica que se caracterizaba por la presencia de dos picos, el primero correspondiente a la elución de la toxina Cry marcada y el segundo a la elución de  $\text{NaI}^{125}$ . Así pues, se tomaban las fracciones de interés correspondientes al primer pico de la gráfica y que se diluían para obtener unas 20000 cpm (cuentas por minuto) para ser analizadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). El gel se secaba y se ponía en contacto con una placa fotográfica X-Omat S Film 100 (Kodak) dentro de un estuche intensificador (Kodak) y se relevaba tras horas o días, en función del número de cpm. Las carreras podían presentar una o dos bandas, una inferior correspondiente al  $\text{NaI}^{125}$  y otra superior correspondiente a la toxina Cry marcada. Así pues, sólo se tomaban para su uso posterior, las fracciones que presentaban la banda correspondiente a la toxina Cry marcada o, las fracciones que presentaban las dos bandas. Nunca se tomaban las fracciones que, aunque tuvieran las dos bandas también presentaran otras, puesto que eran resultado del marcaje de otras proteínas carentes de interés y que podrían interferir en los ensayos de unión.

El segundo de los sistemas empleados para el marcaje fue mediante el uso de Iodo-Beads<sup>®</sup> siguiendo las especificaciones de la casa comercial (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill.). Este es un sistema de marcaje más suave lo que supone una ventaja al haber un menor riesgo de degradación de la toxina a marcar. Además, en el momento que se desee parar la reacción es suficiente con solo la extracción de la bolita de Iodo-Beads<sup>®</sup> del tubo de ensayo. La metodología seguida para el marcaje por este sistema se basó en la puesta en contacto de 0.4 mCi de  $\text{NaI}^{125}$  con una bolita de Iodo-Beads<sup>®</sup> con 50  $\mu\text{l}$  de PBS 1x dejándolo incubar durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadía la toxina Cry a marcar dejando la mezcla de reacción durante 5 min cuidando de no sobrepasar este tiempo por peligro a degradar la

toxina. La validación del resultado del marcaje se correspondía con lo explicado en el método de la cloramina-T.

### **6.3 Determinación de la actividad específica de las toxinas Cry marcadas**

La determinación de la actividad específica de las toxinas Cry marcadas se realizó según el protocolo de Van Rie *et al.* (1989) mediante un ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción mediado por enzimas, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) tipo sándwich en el que en una placa multipocillos se le unía un anticuerpo policlonal contra la Cry de estudio. A continuación, se incubaba con diluciones de la toxina Cry que eran reconocidas y unidas a la placa. Una vez unida la toxina Cry se completaba el sándwich con un anticuerpo primario monoclonal, diana de un segundo anticuerpo, el secundario conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Como sustrato de la fosfatasa alcalina se utilizó p-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma). El producto de la reacción se midió a una longitud de onda de 405 nm (Labsystem Multiscan, Dasit, Italy).

Comparando los niveles de absorbancia obtenidos de las diluciones de la toxina marcada con una escala de concentraciones conocidas de toxinas Cry no marcadas, se determinaba la concentración de toxina Cry marcada y por tanto la actividad específica.

Las actividades específicas de las toxinas Cry marcadas para los ensayos de unión con LAB-PS y SEL-B fueron Cry1Ab-I<sup>125</sup> con una actividad específica de 3.7 mCi/mg y Cry1Ac-I<sup>125</sup> con una actividad de 109 mCi/mg. Ambas fueron marcadas con el método de la cloramina-T

Las toxinas marcadas empleadas en el estudio de las cepas Karak, Cry1Ab-SEL y LAB-UK fueron Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ca. La toxina Cry1Ab fue

marcada con  $^{125}\text{I}$  mediante el método de la cloramina-T, las toxinas Cry1Ac y Cry1Ca fueron marcadas mediante Iodo-Beads<sup>®</sup>. En el caso de la cepa Kluang y cruces (Karak x SERD4, Karak x Kluang y SERD4 x Kluang) las toxinas empleadas para su estudio fueron Cry1Ab y Cry1Ac. La toxina Cry1Ca no se disponía en ese momento. Las toxinas fueron marcadas con cloramina-T.

A partir del cálculo de las actividades específicas de las toxinas de trabajo para los ensayos con las cepas Karak, Cry1Ab-SEL y LAB-UK (**Tabla 13**), la cantidad de toxina marcada en cada tubo de reacción fue de 9, 45 y 180 ng de Cry1Ab- $^{125}\text{I}$ , Cry1Ac- $^{125}\text{I}$  y Cry1Ca- $^{125}\text{I}$ , respectivamente. Para el caso de los ensayos con Kluang y cruces (Karak x SERD4, Karak x Kluang y SERD4 x Kluang) (**Tabla 13**), la cantidad de toxina marcada en cada tubo de reacción fue de 2.7 ng para Cry1Ab- $^{125}\text{I}$  y de 49 pg para Cry1Ac- $^{125}\text{I}$ . En el caso de los ensayos de unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac con BBMV de las diferentes cepas de *B. mori* (J65, Kin y C7) (**Tabla 13**), la cantidad de toxina marcada en cada tubo de reacción fue de 1 ng tanto para Cry1Ab- $^{125}\text{I}$  y de 0.04 ng para Cry1Ac- $^{125}\text{I}$ .

**TABLA 13.** Actividades específicas en mCi/mg de cada una de las toxinas Cry marcadas con Na<sup>125</sup> empleadas en los ensayos de unión con las diferentes cepas de *P. xylostella* y *B. mori*.

Toxina Cry	<i>P. xylostella</i>						<i>B. mori</i>		
	SEL-B	LAB-PS	Karak	Cry1Ab-SEL	Kluang	LAB-UK	J65	Kin	C7
<b>Cry1Ab</b>	3.7	3.7	0.48	0.48	2.02	0.48	5	5	5
<b>Cry1Ac</b>	110	110	0.08	0.08	110	0.08	110	110	110
<b>Cry1Ca</b>	-	-	0.02	0.02	-	0.02	-	-	-



## 6.4 Preparación de BBMV y su caracterización enzimática

Para la preparación de BBMV se siguió el protocolo descrito por Wolfersberger (1990) en el que se produce el aislamiento por precipitación diferencial de las BBMV mediante  $MgCl_2$ . En el caso de obtener las BBMV a partir de individuos enteros como es el caso de *P. xylostella*, el protocolo para su preparación fue el resuelto por Escriche *et al.* (1995).

Para la preparación de BBMV a partir de las diferentes cepas de *P. xylostella* se partió aproximadamente de 1 g de larvas de tercer estadio (unos 250 individuos). En el caso de *B. mori*, se partió de intestinos liofilizados, de los que se tomaron unos 0.1 g de cada cepa para obtener las BBMV.

Tras la congelación en nitrógeno líquido del material de partida, se añadían 9 volúmenes de tampón estabilizante MET (0.3 manitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris-HCl pH 7,5) frío por peso de muestra inicial y se homogeneizaba a 8000 rpm a 4 °C mediante un homogeneizador de cuchillas (Ultra Turrax<sup>®</sup>, IKA). Posteriormente, se añadía un volumen de  $MgCl_2$  (24 mM), se mezclaba bien y se dejaba en reposo durante 15 min a 4 °C. Seguidamente se llevaba una doble centrifugación, a 4500 rpm durante 15 min, de la que se tomaba el sobrenadante, el cual se centrifugaba a 16000 rpm durante 30 min. El precipitado obtenido se resuspendía mediante medio volumen de tampón MET con el Potter durante 1 min. Se añadía medio volumen de  $MgCl_2$  (24 mM) y se dejaba durante 15 min en reposo. Finalmente, se repetían las dos centrifugaciones y el precipitado final se resuspendía con tampón MET. Se preparaba una serie de alícuotas de 100  $\mu$ l y se congelaban con nitrógeno líquido para ser guardarlas a -80 °C hasta su uso. Se tomaba una alícuota para cuantificar la concentración de BBMV por el método de Bradford (1976).

### 6.4.1 Fosfatasa alcalina (FAL)

La presencia de esta enzima en una amplia variedad de organismos indica la importancia del papel que desempeña. Esta enzima se caracteriza, en términos generales, por presentar una función hidrolasa/transferasa, tener una estructura dimérica con una actividad dependiente de  $Zn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ , y presentar una región aminoacídica común, alrededor del sitio activo, en FAL de diferentes organismos. Además, la FAL es una glicoproteína anclada en la membrana celular a través de un residuo GPI (Eguchi, 1995; Pigott y Ellar, 2007).

Para el cálculo de la actividad enzimática de la FAL se utilizó el kit comercial *Alkaline Phosphatase Detection Kit* (Sigma, St. Louis, MO. USA). El método en el que se fundamenta es en que la FAL cataliza la transferencia del grupo fosfato del 4-nitrofenilfosfato a la dietanolamina (DEA) liberando 4-nitrofenol. La concentración catalítica de la FAL se determina a partir de la velocidad de formación del 4-nitrofenol medido a 405 nm.

Así pues, para la cuantificación de la actividad de la FAL de las BBMV se partía de 0.5 mg/ml de BBMV diluidas en tampón PBS 1x, a lo que se añadía el reactivo de trabajo consistente en una mezcla de 4-nitrofenilfosfato y DEA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez preparada, se medía la absorbancia inicial a 405 nm así como, a intervalos de 1 min durante un total de 10 min. Se calculaba el  $\Delta A$  por minuto y el promedio final para, mediante el siguiente factor de conversión  $\Delta A/\text{min} \times 2764$ , obtener el valor en unidades U/l. Mediante el cociente de este valor con la concentración utilizada de BBMV se calculaba la actividad enzimática en  $U/mg_{\text{BBMV}}$ . Se hicieron dos réplicas por cada una de las cepas de estudio.

### 6.4.2 $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT)

El enzima GGT tiene una función muy importante en el metabolismo del glutatión, es una glicoproteína heterodimérica que se encuentra anclada en la membrana celular por el extremo hidrofóbico amino terminal (Ikeda *et al.*, 1995).

Para el cálculo de la actividad enzimática de la GGT se utilizó el kit comercial *Gamma-Glutamil Transpeptidase Detection Kit* (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO. USA). Este método se fundamenta en que la enzima GT cataliza la transferencia del grupo  $\gamma$ -glutamilo de la  $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida al compuesto glicilglicina, liberando 3-carboxi-4-nitroanilina. La concentración catalítica de esta enzima se determina a partir de la velocidad de formación del 3-carboxi-4-nitroanilina medido a 405 nm.

En este caso la reacción consistía en la mezcla de 0.5 mg/ml de BBMV en PBS 1x con el reactivo consistente en glicilglicina y  $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez preparada, se media la absorbancia inicial a 405 nm así como a intervalos de 1 min durante un total de 10 min. Se calculaba el  $\Delta A$  por minuto y el promedio final para, mediante el siguiente factor de conversión  $\Delta A/\text{min}$  1111, obtener el valor en unidades U/l. Mediante el cociente de este valor con la concentración utilizada de BBMV se calculaba la actividad enzimática en U/mg<sub>BBMV</sub>. Se hicieron dos réplicas por cada una de las cepas de estudio.

### 6.4.3 Leucin aminopeptidasa (LAP)

Las leucin aminopeptidasas son metaloproteasas que cortan por el extremo N-terminal tanto de proteínas como de péptidos, a través de residuos Leu aunque también reconocen otros residuos (Matsui *et al.*, 2006).

Para el cálculo de la actividad enzimática de la LAP se utilizó el kit comercial *Leucin Aminopeptidase Detection Kit* (Sigma, St. Louis, MO. USA). La enzima LAP cataliza la primera de las siguientes reacciones: L-leucil- $\beta$ -naftilamida +  $H_2O \rightarrow$  L-leucina +  $\beta$ -naftilamina. Sin embargo, la concentración de  $\beta$ -naftilamina es medida gracias a dos reacciones posteriores:  $\beta$ -naftilamina +  $NaNO_2 \rightarrow$  reactivo Diazo + N-(1-naftil)-etilenamida  $\rightarrow$  marcador Azul Azo. Así pues, la  $A_{540}$  del Azul Azo es proporcional a la concentración de  $\beta$ -naftilamina, la cual a su vez, refleja la actividad de original de la enzima LAP.

Para el cálculo de la actividad enzimática de la LAP se requería la elaboración de una recta de calibrado mediante una mezcla de reacción con cantidades conocidas del sustrato  $\beta$ -naftilamina. Los resultados obtenidos tras la lectura de las reacciones se representaban en una recta, siendo el eje de ordenadas los datos de  $A_{540}$  y el eje de abscisas los  $\mu g$  de  $\beta$ -naftilamina. De esta forma, para calcular la actividad de la enzima LAP en las BBMV se preparaban una serie de reacciones mediante los reactivos que incluía el kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de BBMV empleadas fueron de  $1 \cdot 10^{-3}$  mg/ml de BBMV de SEL-B y LAB-PS,  $1 \cdot 10^{-4}$  mg/ml de Karak, Cry1Ab-SEL y LAB-UK, y  $5 \cdot 10^{-5}$  mg/ml de Kluang. En el caso de las cepas de *B. mori*, J65, C7 y Kin fueron se emplearon  $1 \cdot 10^{-3}$  mg/ml de BBMV procedentes de distintas preparaciones.

Con la medida final de  $A_{540}$  se obtenía el valor de  $\mu g$  de la  $\beta$ -naftilamina correspondiente al eje de abscisas a partir de la recta de calibrado. Con este valor y tras diferentes conversiones de unidades, se obtenía la actividad de la LAP en  $\mu moles/min$  por mg de BBMV. Se hicieron dos réplicas por cada una de las cepas de estudio.

## 6.5 Cinética de unión

Los ensayos de cinética de unión se llevaron a cabo para conocer el tiempo de incubación adecuado entre las BBMV, procedentes de las cepas de *B. mori*, y las toxinas Cry de ensayo. Para ello, se utilizaron diferentes tiempos de incubación tras los que se midió la radiactividad residual después de un proceso de centrifugado. Se tomó como cepa de referencia la J65 usando una concentración final en la mezcla de reacción de 0.05 mg/ml de BBMV. Los componentes de la mezcla de reacción para medir la unión total fueron tampón PBS 1x-BSA 0.1%, toxina marcada Cry1Ab-I<sup>125</sup> o Cry1Ac-I<sup>125</sup>, y el volumen necesario para obtener una concentración final requerida de 0.05 mg/ml de BBMV. Para medir la unión inespecífica, la mezcla y el orden de los componentes de la reacción fueron los mismos, con la salvedad de que se incluía, después de la adición del tampón PBS 1x-BSA 0.1%, un exceso de la toxina Cry no marcada. De esta forma, fueron preparados diferentes tubos con la mezcla de reacción, se midieron las cpm iniciales (10000 cpm) y se incubaron a diferentes tiempos, desde 10 a 100 min.

Transcurrido este tiempo, la toxina unida fue separada de la toxina libre mediante un par de centrifugaciones a 11000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado se lavaba con 0.5 ml PBS 1x-BSA 0.1% y las cpm finales eran medidas. Se realizó únicamente una réplica por punto.

## 6.6 Ensayos de unión

Para determinar los parámetros bioquímicos de la unión de las toxinas Cry a BBMV, se llevaron a cabo los denominados ensayos de unión, en los que se media la radiactividad que quedaba unida a las BBMV tras ser incubadas con toxina marcada con I<sup>125</sup> (Hofmann *et al.*, 1988). Mediante este tipo de ensayo se averiguaba la presencia/ausencia de unión específica de la toxina Cry marcada a BBMV preparadas a partir del insecto de estudio. Además, también

se conseguía averiguar la concentración de BBMV adecuada para poder ver unión en los ensayos de competencias entre toxinas (apartado 6.7) (Sayyed *et al.*, 2000).

En este tipo de ensayos existen dos parámetros clave, el tiempo óptimo de incubación de las toxinas Cry con las BBMV y las concentraciones óptimas de toxina marcada. El tiempo de incubación óptimo para los ensayos con BBMV de *P. xylosteella* fue de 1h según los resultados de otros trabajos (Sayyed *et al.*, 2000) en los que, a través de ensayos de cinética de unión, se mostraba como el tiempo adecuado para poder observar un buen porcentaje de unión. En el caso de los ensayos de unión con *B. mori*, el tiempo de incubación fue de 100 min. Las cpm iniciales de toxina marcada añadidas a la reacción fueron alrededor de 10000 cpm, tras comprobar, gracias a la actividad específica de cada marcaje, que era una cantidad adecuada de toxina Cry marcada. La cantidad de toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup> fue de 1.21 ng y de Cry1Ac-I<sup>125</sup> 0.82 ng en los ensayos de unión de las cepas SEL-B y LAB-PS. En el caso de las cepas resistentes Karak y Cry1Ab-SEL como de la susceptible LAB-UK la cantidad de toxina marcada por tubo de ensayo fue de 9.31, 45 y 180.2 ng de Cry1Ab-I<sup>125</sup>, Cry1Ac-I<sup>125</sup> y Cry1Ca-I<sup>125</sup>, respectivamente. Para el caso de los ensayos con Kluang las cantidades fueron de 2.7 ng para Cry1Ab-I<sup>125</sup> y de 49.2 pg para Cry1Ac-I<sup>125</sup>. En el caso de los ensayos con las cepas de *B. mori* (J65, Kin y C7) fueron de 1 ng para Cry1Ab-I<sup>125</sup> y de 0.04 ng para Cry1Ac-I<sup>125</sup>.

De los experimentos de unión se obtenían dos tipos de curvas, una de unión total y la otra de unión inespecífica. La primera se obtenía de la mezcla de reacción siguiente: toxina Cry marcada, una determinada concentración de BBMV, todo ello resuspendido en tampón frío PBS 1x-BSA 0.1%. La curva de unión inespecífica se obtenía con la reacción siguiente: un exceso de toxina Cry fría (2000 ng), o no marcada, y una concentración determinada de toxina Cry marcada y de BBMV, todo ello resuspendido en tampón frío PBS 1x-BSA 0.1%. De los resultados de unión inespecífica se obtenía una ecuación de la que se extrapolaba la unión específica a partir de los resultados

de unión total. En ambos casos el volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml.

Tras finalizar la elaboración de las mezclas en ambos tipos de reacciones se medían las cpm iniciales antes de empezar con el tiempo de incubación. Transcurrido este período, la toxina Cry unida era separada de la toxina Cry libre mediante un par de centrifugaciones a 11000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado era lavado con 0.5 ml PBS 1x-BSA 0.1% entre cada una de ellas. Tras el último lavado se medían las cpm finales como índice de unión de las toxinas Cry. El número de réplicas fueron de al menos dos por punto.

### **6.7 Ensayos de competencias y cálculo de los valores $K_d$ y $R_t$**

Este tipo de ensayos fueron llevados a cabo con las cepas de *B. mori* J65, Kin y C7. Las competencias homólogas y heterólogas entre las toxinas fueron llevadas a cabo incubando las toxinas marcadas Cry1Ab-I<sup>125</sup> y Cry1Ac-I<sup>125</sup> en presencia de concentraciones crecientes (0-2048 ng) del competidor no marcado y a la concentración de BMV de 0.20 mg/ml para los ensayos con Cry1Ab-I<sup>125</sup> y de 0.18 mg/ml para Cry1Ac-I<sup>125</sup>. Las cantidades de toxinas marcadas fueron de 1 ng para Cry1Ab-I<sup>125</sup> y de 0.04 ng para Cry1Ac-I<sup>125</sup>. Todos los ensayos de unión fueron repetidos al menos dos veces.

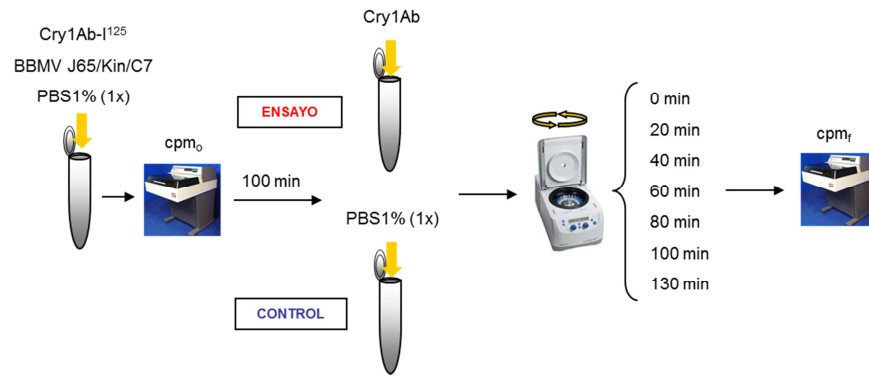
La estimación de los valores cuantitativos de unión como son la constante de disociación  $K_d$  y la concentración de sitios de unión  $R_t$ , se obtuvieron tras el tratamiento de los datos con el programa informático LIGAND (Munson y Rodbard, 1980).

## 6.8 Determinación de la unión reversible-irreversible de las toxinas Cry

La determinación de los componentes reversible e irreversible de la unión de la toxina Cry1Ab en BBMV de *B. mori* (J65, Kin, y C7), se llevaron a cabo mediante los experimentos llamados de asociación-disociación según la metodología basada en Chen *et al.* (1995). Los experimentos de asociación se llevaron a cabo incubando 0.13 nM de toxina Cry1Ab-<sup>125</sup>I con 0.2 mg/ml de BBMV hasta alcanzar el equilibrio a los 100 min (**Fig. 30**). Posteriormente, un exceso (20000 veces más) de toxina Cry1Ab no marcada era añadida para empezar con la fase de disociación, la cual fue interrumpida a diferentes tiempos (0-140 min) mediante un proceso de centrifugación a 16100 *g* a 4 °C durante 10 min (**Fig. 30**). El precipitado obtenido fue lavado un par de veces con 0.5 ml de PBS1x-BSA 0.1% a 4 °C. La radioactividad del precipitado fue medida con el contador de radiación gamma Compugamma 1282 (LKB Pharmacia) (**Fig. 30**). La unión específica fue calculada restando a cada uno de los puntos de unión total, la unión no específica (obtenida en los ensayos de unión del apartado 6.6). Los experimentos de control presentaban tampón PBS 1x en lugar de un exceso de toxina no marcada (**Fig. 30**).

Los porcentajes de unión irreversible y reversible se determinaron de la siguiente manera: como valor de unión irreversible se tomó la unión específica que quedaba tras la incubación de los 140 min y como valor de unión reversible la diferencia entre el valor de unión específica total y el de la unión irreversible. Se tomó como valor de unión específica total al obtenido a tiempo 0 min de los experimentos de disociación. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.





**FIGURA 30. Determinación de la unión reversible-irreversible de las toxinas Cry.** Resumen de la metodología seguida para la determinación de la unión reversible-irreversible de las toxinas Cry, así como del control, en BBMVs de las cepas J65, Kin y C7 de *B. mori*.

## 6.9 Ensayos de bloqueo de la unión con anticuerpos

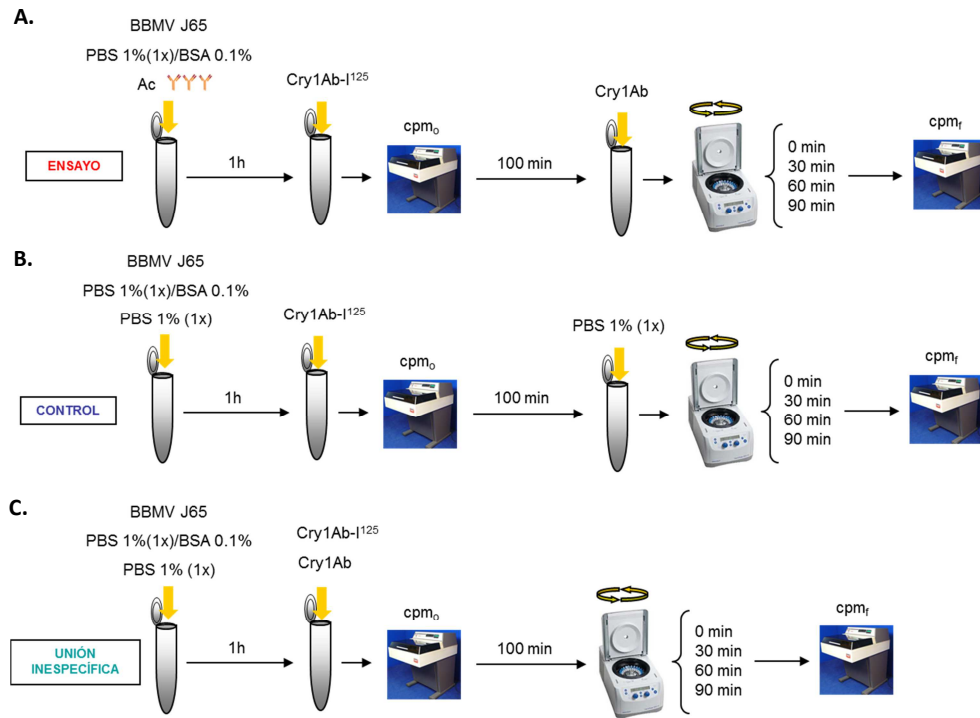
Los anticuerpos utilizados en los ensayos de bloqueo de la unión en la cepa J65 de *B. mori* fueron preparados por el grupo del Dr. Sato (Ibiza-Palacios *et al.*, 2008), siendo: anticuerpos anti-GST (glutación S-transferasa), anti-BtR175 y anti-BmAPN1, y un antisuero específico frente BmAPN3. El anticuerpo anti-BtR175 estaba preparado a partir de la región de unión a la toxina Cry1Aa (posiciones nucleotídicas 3322-4392 codificantes de la región Glu<sup>1108</sup>-Val<sup>1464</sup> de la proteína tipo caderina BtR175 de *B. mori*). El anticuerpo anti-BmAPN1 estaba preparado a partir de la región de unión situada entre las posiciones Ile<sup>135</sup>-Pro<sup>198</sup> de la aminopeptidasa BmAPN1 (Hara *et al.*, 2003). El antisuero anti-BmAPN3 fue preparado empleando como antígeno una región de la BmAPN3 en la que quedaba situada parte de la región de unión de la toxina Cry1Aa (Nakanishi *et al.*, 2002).

La inhibición de las diferentes moléculas BtR175, BmAPN1 y BmAPN3 fue llevada a cabo preincubando durante 1h, las BBMVs con 1 mM del anticuerpo específico correspondiente (anti-BtR175, anti-BmAPN1) o con una dilución de 1:20000 del antisuero (anti-APN3) en tampón PBS 1x-BSA 0.1%, a temperatura

ambiente (25 °C) (**Fig. 31A**). Después de este tiempo de incubación se procedió a la fase de asociación, incubando la mezcla de reacción anterior con 0.34 nM de Cry1Ab-I<sup>125</sup> durante 100 min (**Fig. 31A**). Como unión total se tomó el valor obtenido justo tras terminar el transcurso de los 100 min. La fase de disociación se llevó a cabo añadiendo un exceso (1000 veces) de toxina Cry1Ab no marcada tras la fase de asociación. Este proceso se detuvo a diferentes tiempos de incubación mediante centrifugación (**Fig. 31A**). El último valor de unión tomado tras el lavado de los 100 min de incubación fue el que determinó la unión irreversible. La unión reversible fue calculada restando al valor de unión total el valor de la unión irreversible.

Se llevaron a cabo dos tipos diferentes de controles (**Fig. 31B**). El primero de ellos perseguía dos objetivos, averiguar la integridad de las BBMV durante todo el transcurso del experimento y comprobar el mantenimiento de la unión de la toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup> a lo largo del tiempo. Para ello, se incubó, en lugar del anticuerpo, tampón PBS 1x durante 1h. Tras este tiempo se añadía la toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup> a la que, tras los 100 min de incubación de la fase de asociación, se añadía tampón PBS 1x en lugar de toxina sin marcar. Los lavados se hacían a los mismos tiempos. El segundo de los controles se basó en la incubación de las BBMV con el anticuerpo anti-GST con el objetivo de determinar que el anticuerpo de revelado no interfería en los ensayos (**Fig. 31B**).

El cálculo de la unión inespecífica (**Fig. 31C**) se llevó a cabo incubando a la vez la toxina marcada Cry1Ab-I<sup>125</sup> y la no marcada tras la preincubación de las BBMV con PBS 1x durante 1h. Además, para averiguar si los anticuerpos podían estar involucrados en el porcentaje de unión inespecífica de las toxinas Cry, también se llevaron a cabo estos mismos ensayos pero mediante una preincubación con los anticuerpos anti-GST y anti-BmAPN3. El valor obtenido fue restado a cada uno de los valores de unión obtenidos en los ensayos. Todos los experimentos fueron realizados al menos por duplicado.



**FIGURA 31. Metodología seguida en los ensayos de bloqueo de la unión de Cry1Ab a BBMVs de la cepa J65 de *B. mori*.** (A) Esquema de los distintos ensayos de bloqueo de la unión de la toxina Cry1Ab a BBMVs de la cepa J65 de *B. mori* a través de los anticuerpos anti-BtR175, anti-BmAPN1, suero anti-BmAPN3 y anti-GST. También se muestra el proceso llevado a cabo como control de este tipo de ensayos (C), así como el empleado para el cálculo de la unión inespecífica de Cry1Ab (C) en las BBMVs preparadas.

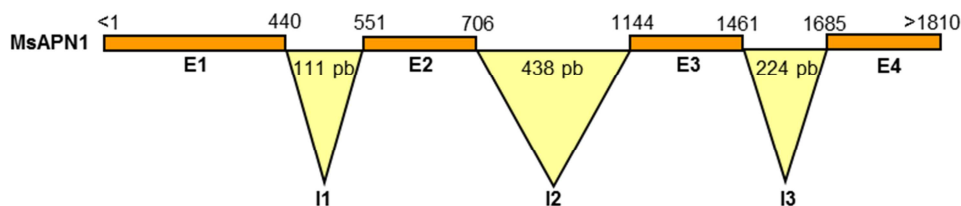
## IV. RESULTADOS

### BLOQUE I. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LIGAMIENTO DE GENES CODIFICANTES PARA LOS RECEPTORES DE LAS TOXINAS Cry

#### 1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS AMINOPEPTIDASAS

##### 1.1 Caracterización parcial de la estructura genómica de diferentes aminopeptidasas de *P. xylostella*

Tras la publicación de cuatro aminopeptidasas en *P. xylostella*: PxAPN1 (X97878), PxAPN2 (AJ222699), PxAPN3 (AF109692) y PxAPNA (AF020389), se decidió averiguar la estructura genómica que presentaban con el fin de poder encontrar un alelismo para futuros estudios de ligamiento. Para llevar a cabo este estudio se empleó como secuencia modelo la secuencia genómica de la APN1 de *Manduca sexta* MsAPN1 (AB007039). Esta secuencia presentaba tres intrones y cuatro exones secuenciados (Fig. 32). Así pues, como primer paso, se tomaron el primer y segundo exón y se alinearon con las cuatro aminopeptidasas de *P. xylostella*. Con este alineamiento se consiguieron diseñar diferentes cebadores (descritos en el apartado 5.1.1.1 de Material y Métodos) con los que se obtuvieron diferentes amplificados mediante PCR para cada una de las secuencias aminopeptidasas de *P. xylostella*.



**FIGURA 32.** Estructura genómica parcial de la MsAPN1 de *M. sexta* publicada (AB007039). Esta secuencia se caracteriza por la presencia de cuatro exones (E) y tres intrones (I).

Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas y se obtuvieron los siguientes valores de identidad entre la secuencia de ADNc APN1 de *M. sexta* con cada una de las aminopeptidasas de *P. xylostella*: 48% (MsAPN1-APN1), 49% (MsAPN1-APN2), 50% (MsAPN1-APN3) y 63% (MsAPN1-APNA). También se obtuvieron los valores de identidad entre las secuencias aminopeptidasas de *P. xylostella* fueron del 21% entre APN1-APN2, 5% APN1-APN3, 14% APN1-APNA, 21% APN2-APN3, 33% APN2-APNA y del 43% entre APN3-APNA.

Las primeras pruebas de amplificación con los cebadores diseñados se hicieron con individuos de la colonia susceptible LAB-PS de *P. xylostella* obteniéndose amplificados que diferenciamos de las secuencias publicadas con un asterisco (\*). Así pues, se pudieron amplificar la PxAPN1\* (código de acceso al Genbank: KC767735), PxAPN2\* (KC767736) y PxAPNA\* (AY928011). Los tamaños de los amplificados en estas aminopeptidasas difirieron del tamaño esperado por la secuencia de ADNc, por lo que la zona amplificada podría albergar al menos un intrón (**Fig. 33**). La presencia de los intrones fue corroborada tras la secuenciación de los amplificados, observando que la PxAPN1\* y la PxAPNA\* contenían un único intrón, y dos intrones en el caso de la PxAPN2\*.

El caso de la amplificación de la APN3 fue diferente al resto de las aminopeptidasas de estudio. Diferentes parejas de cebadores fueron diseñados

para su amplificación tomando como secuencia modelo la PxAPN3 (AF109692) de *P. xylostella*. Sin embargo, con ninguno de estos cebadores se logró amplificar esta aminopeptidasa por lo que se diseñaron cebadores degenerados a partir del alineamiento de otras secuencias homólogas a la PxAPN3, en concreto la BmAPN3 (AF352574) y HaAPN3 (AY052651) (apartado 5.1.1.2 de Material y Métodos). Con estos cebadores sí se consiguió amplificar la PxAPN3 en individuos de la colonia LAB-PS de *P. xylostella*. Los amplificadores obtenidos quedaban representados por cuatro bandas de aproximadamente, 800, 550, 400 y 200 pb. Tras su secuenciación únicamente la banda de 800 pb se correspondía con la APN3 buscada a la que, en adelante, se hará referencia como PxAPN3\* (KC767737). A partir de esta secuencia se diseñaron cebadores específicos, para evitar la aparición de amplificaciones no deseadas.

Es importante señalar que tras el proceso de secuenciación y alineamiento del amplificado PxAPN3\* con la secuencia PxAPN3 publicada dio como resultado un porcentaje de identidad bastante bajo (68%). El análisis de PxAPN3\* con el programa BLASTn mostró que existía un porcentaje de identidad mucho mayor (100%) con otra APN3 publicada en *P. xylostella*, la PxAPN3R (GU213041). Esta secuencia, aunque se encontraba parcialmente secuenciada, se diferenciaba de la PxAPN3 en una región de unas 143 pb, región en la que, tras su análisis, quedaba situado un intrón (**Fig. 34**). La traducción y posterior análisis con el programa SMART de esta región en PxAPN3 (AAF01259) y PxAPN3R (ADA59493.1), mostró que pertenecía a un dominio de la familia de las peptidasas M1 (según la base de datos Pfam). El nivel de similitud frente a dominios de esta familia fue mayor en el caso de PxAPN3 que en PxAPN3R (70.7 vs 36.6). Esta diferencia podía deberse a que la región entre los aminoácidos 155 y 260 de la PxAPN3 difiere en gran medida de la región comprendida entre los aminoácidos 13 y 122 de la PxAPN3R. El análisis de similitud entre nuestra secuencia de aminoácidos PxAPN3\* frente la PxAPN3R y la PxAPN3 fue del 96% y 56%, respectivamente.

Los intrones de las PxAPN1\*, PxAPN2\* y PxAPNA\* se caracterizaron por tener un tamaño similar entre sí, sin embargo, el intrón de la PxAPN3\* difería del resto por ser el más pequeño (**Fig. 33**). En cuanto a la posición de los intrones podemos decir que se situaban en puntos equivalentes en los casos de la PxAPN1\*, PxAPNA\* y segundo intrón de la PxAPN2\*. *A priori*, el intrón descrito en la PxAPN3\* quedaba desplazado en dirección 5' pero, debido a que a la secuencia PxAPN3R le faltaban aproximadamente las primeras 430 pb (por no estar totalmente secuenciada) podría decirse que este intrón podía situarse en una posición equivalente al resto de los intrones descritos (**Fig. 33**).

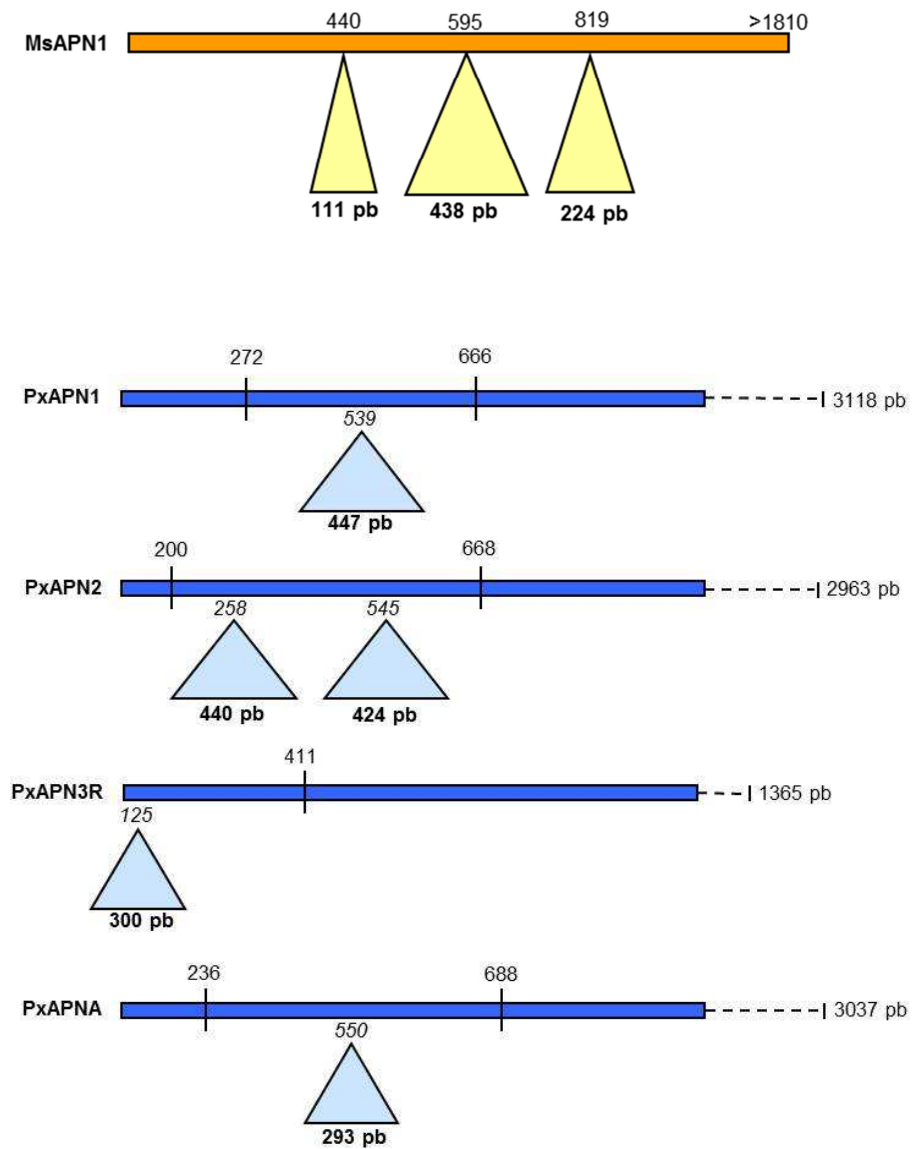
Al comparar la posición de éstos intrones con la posición de los intrones de la secuencia MsAPN1 podemos decir que los intrones de la PxAPN1\*, PxAPN3\*, PxAPNA\* y segundo intrón de la PxAPN2\*, se situaban aproximadamente a unas 100 pb en dirección 3' del punto de inserción del primer intrón de la secuencia MsAPN1 (**Fig. 33**). La situación del primer intrón descrito en PxAPN2\* no coincidió con ninguna de las posiciones de los intrones descritos en MsAPN1 (**Fig. 32**), de hecho se situaba a 182 pb en dirección 5' del primer intrón descrito en MsAPN1.

Todas las secuencias intrónicas descritas fueron alineadas entre sí, así como frente a todos los intrones de la secuencia MsAPN1 publicada. El resultado fue una ausencia de homología entre todas ellas. Las regiones exónicas fueron alineadas con sus respectivas secuencias publicadas en GenBank, dando un porcentaje de identidad de prácticamente el 100% exceptuando el caso del amplificado de MsAPN1\* y PxAPNA\*. La secuencia amplificada MsAPN1\* presentó una transición de A a G en la posición 302 respecto la secuencia MsAPN1 publicada, este cambio daba como resultado una mutación no sinónima conservativa puesto que se produjo un intercambio entre dos aminoácidos polares, de Tyr<sup>101</sup> a Cys. En el caso de PxAPNA\* se encontraron ocho cambios nucleotídicos respecto a la secuencia de referencia PxAPNA (AF020389), concretamente en las posiciones 350 (A→C), 431 (T→A), 542 (T→C), 544 (A→C), 545 (T→A), 587 (A→C), 629 (A→C) y 671 (A→G). Seis de

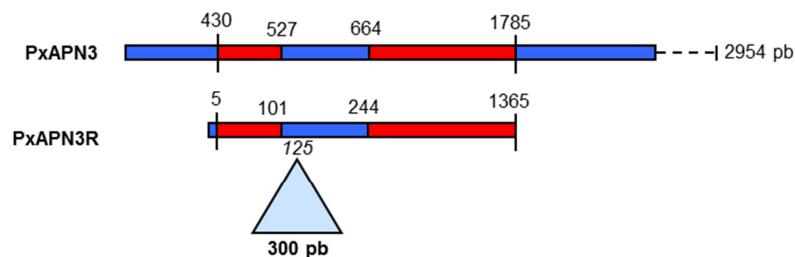
estos cambios resultaron ser mutaciones silenciosas, siendo los aminoácidos: Ile<sup>116</sup>, Pro<sup>143</sup>, Gly<sup>180</sup>, Ala<sup>195</sup>, Ala<sup>209</sup> y Pro<sup>223</sup>. En cambio, el cuarto y quinto cambio nucleotídico dio como resultado una mutación no sinónima conservativa, habiendo un intercambio entre el aminoácido de carácter polar Asn<sup>181</sup> por Thr.

La traducción de todas las secuencias obtenidas y posterior análisis con la herramienta BLASTp así como con SMART, permitió definir a las secuencias como parte de un dominio relacionado con las metalopeptidasas dependientes de zinc como son las M1 (base de datos Pfam), en las que se encuentran las aminopeptidasas N.





**FIGURA 33.** Esquema en el que se representa la estructura genómica parcial de las diferentes aminopeptidasas de *P. xylostella* PxAPN1\* (KC767735), PxAPN2\* (KC767736), PxAPN3\* (KC767737) y PxAPNA\* (AY928011) en individuos LAB-PS. En la parte superior se incluye la estructura genómica parcial de la APN1 de *M. sexta* como modelo de referencia. Las zonas amplificadas se delimitan por dos pequeñas líneas verticales. Mediante triángulos se representa el tamaño de los intrones secuenciados, así como su punto de inserción. La línea discontinua representa la parte restante de la secuencia. Al final de cada secuencia se indica el tamaño de la aminopeptidasa publicada.



**FIGURA 34.** Esquema de las dos secuencias nucleotídicas alineadas de PxABN3 (AF109692) y PxABN3R (GU213041) de *P. xylostella*. En rojo se representa las regiones que entre ellas presentan una elevada identidad. El intrón quedaría ubicado en la secuencia PxABN3R.

## 1.2 Estructura genómica de las aminopeptidasas en otras especies de insectos: *Helicoverpa armigera* y *B. mori*

Se llevó a cabo con *H. armigera* y *B. mori* la misma estrategia de diseño de cebadores empleando las secuencias publicadas de ADNc, la HaAPN1 (AY358034) y la BmAPN (AB007038). Como en el apartado anterior, se tomó como secuencia modelo los dos primeros exones de la secuencia genómica APN1 de *M. sexta* con el fin de localizar un posible primer intrón (Fig. 32).

Los resultados obtenidos mostraron amplificadas de un tamaño mayor de lo esperado, indicando la posibilidad de la presencia de, al menos, un intrón. Estas secuencias las diferenciaremos de las publicadas con un asterisco (\*). Con los resultados de secuenciación se corroboró la existencia del mismo, caracterizándose por tener un tamaño de 1954 pb en la aminopeptidasa 1 de *H. armigera* HaAPN1\* (AY928012) y de 79 y 90 pb en la aminopeptidasa de *B. mori* BmAPN\* (AY928010) (Fig. 35). La presencia de los dos intrones en BmAPN\* fue corroborada analizando el amplificado obtenido con la base de datos EST (*Expressed Sequence Tags*) SilkBase-*Bombyx mori* (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp>) (Mita et al., 2003). Además, con este análisis se determinó que esta secuencia se situaba en el cromosoma 9 de *B. mori*. Las

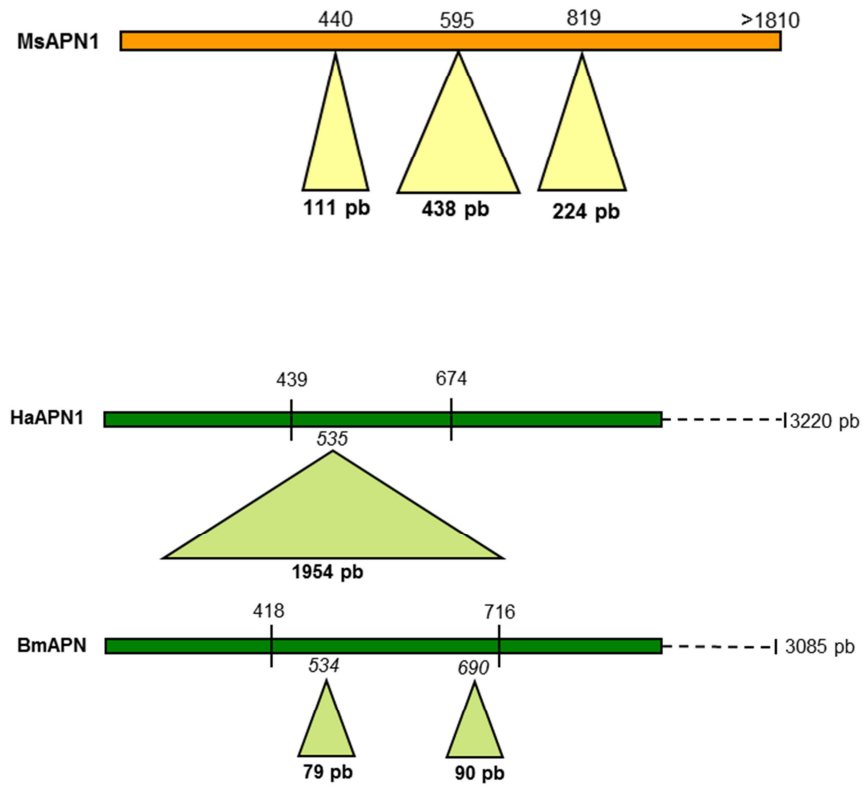
regiones exónicas presentaron un porcentaje de identidad del 100% respecto a sus respectivas secuencias publicadas.

A pesar de la diferencia en tamaño entre el intrón de la HaAPN1\* y el primero de BmAPN\*, la ubicación de ambos era homóloga ya que en la secuencia de la HaAPN1 el intrón se situaba en la posición 535 y en la BmAPN en la posición 533 (**Fig. 35**). Además, estos intrones compartían una posición muy similar a la de los intrones descritos en la PxAPN1\*, PxAPN3R\* y PxAPNA\*, y segundo intrón de la PxAPN2\* (**Fig. 33**). Del segundo intrón descrito en la secuencia de BmAPN\*, no podemos decir si existe en la HaAPN1\* ya que no se abarcó tanto amplificado como en la BmAPN\* (235 vs 298 pb) (**Fig. 35**).

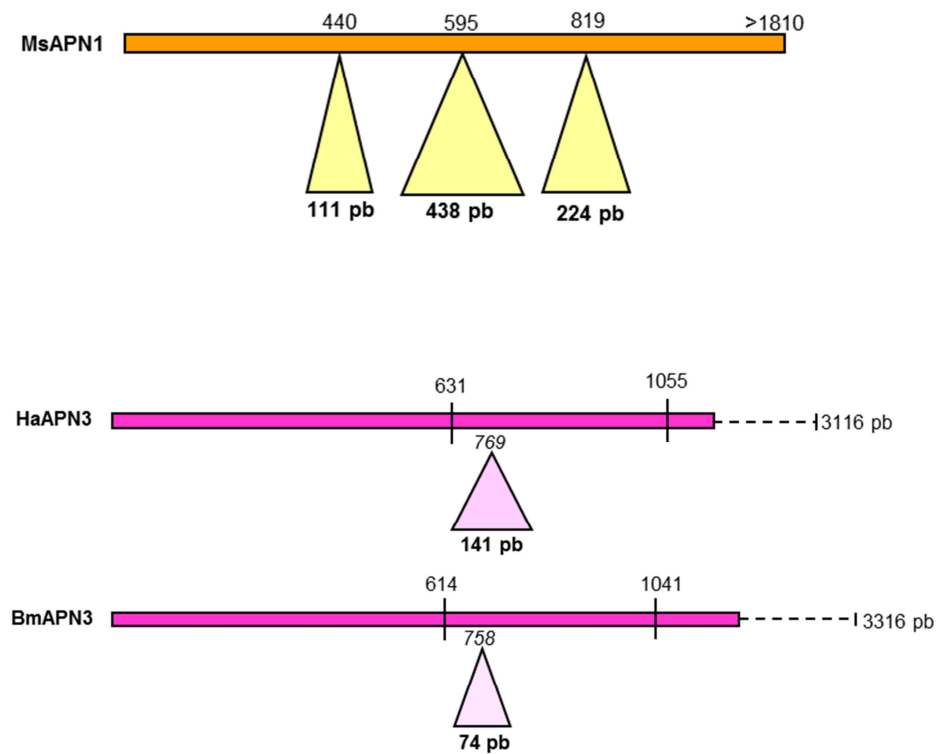
Con el fin de conocer más la estructura genómica de otras aminopeptidasas en *B. mori* y *H. armigera* se tomaron como secuencias modelo las aminopeptidasas 3 publicadas en *B. mori* BmAPN3 (AF352574) y *H. armigera* HaAPN3 (AY052651) tomadas de la base de datos GenBank. Las parejas de cebadores óptimos para su amplificación se situaron en una región aguas abajo a la región hasta ahora analizada en el resto de aminopeptidasas estudiadas. Se amplificó un intrón cuya posición fue muy similar en ambas secuencias, aunque el intrón descrito en la HaAPN3\* (141 pb) fue mayor que el descrito en BmAPN3\* (74 pb) (**Fig. 36**). Al comparar estos resultados con la secuencia genómica de MsAPN1 se comprobó que estos intrones no compartían posición con ninguno de los tres descritos en la MsAPN1 (**Fig. 32**).

El análisis de la secuencia BmAPN3\* con la base de datos EST de *B. mori*, confirmó la presencia del intrón descrito, así como la situación de esta secuencia en el cromosoma 9 de *B. mori*, igual que ocurría con la secuencia BmAPN.

Las regiones exónicas de ambas secuencias HaAPN3\* y BmAPN3\* presentaron un porcentaje de identidad del 100% respecto a sus respectivas secuencias publicadas.



**FIGURA 35.** Representación del primer intrón secuenciado en las secuencias genómicas parciales de la HaAPN1\* de *H. armigera* (AY928012) y BmAPN1\* de *B. mori* (AY928010). En la parte superior se incluye la estructura genómica parcial de la APN1 de *M. sexta* como modelo de referencia. Las zonas amplificadas se delimitan por dos pequeñas líneas verticales. Mediante triángulos se representa el tamaño de los intrones secuenciados, así como su punto de inserción. La línea discontinua representa la parte restante de la secuencia. Al final de cada secuencia se indica el tamaño de la aminopeptidasa publicada.



**FIGURA 36. Representación del primer intrón secuenciado en las secuencias de las secuencias genómicas parciales de la HaAPN3\* de *H. armigera* (KJ832073) y BmAPN3\* en *B. mori* (KJ832074).** En la parte superior se incluye la estructura genómica parcial de la APN1 de *M. sexta* como modelo de referencia. Las zonas amplificadas se delimitan por dos pequeñas líneas verticales. Mediante triángulos se representa el tamaño de los intrones secuenciados, así como su punto de inserción. La línea discontinua representa la parte restante de la secuencia. Al final de cada secuencia se indica el tamaño de la aminopeptidasa publicada.

### 1.3 Análisis filogenético

El análisis filogenético de las secuencias genómicas parciales descritas en este trabajo: PxAPN1\*, PxAPN2\*, PxAPN3\* y PxAPNA\*, se realizó para conocer la relación filogenética de las PxAPN3\* y PxAPNA\* con el resto de aminopeptidasas N descritas en otras especies de lepidópteros, pues eran las que diferían de sus respectivas secuencias publicadas. Las secuencias genómicas parciales: HaAPN1\*, HaAPN3\*, BmAPN\* y BmAPN3\*, no se incluyeron en este análisis por su completa identidad con sus respectivas secuencias publicadas.

Como resultado de este análisis se obtuvo un filograma similar al descrito por el grupo de Crava *et al.* (2010) y por el recientemente publicado por Hughes (2014) (**Fig. 37**). Se determinaron ocho clases de aminopeptidasas y un grupo de aminopeptidasas sensibles a la puromicina (ASP), un tipo de aminopeptidasa citosólica. Cada una de estas clases se sustentaba con valores de *bootstrap* de 1000. El árbol filogenético obtenido presentaba dos grandes grupos, el constituido por las aminopeptidasas de clase 5, 6 y 7 y el formado por el resto de aminopeptidasas (**Fig. 37**). Varias clases se podían considerar como grupos hermanos tales como la clase 2 y las ASP, las clases 1-3, 4-8 y las 5-6-7 (Hughes, 2014).

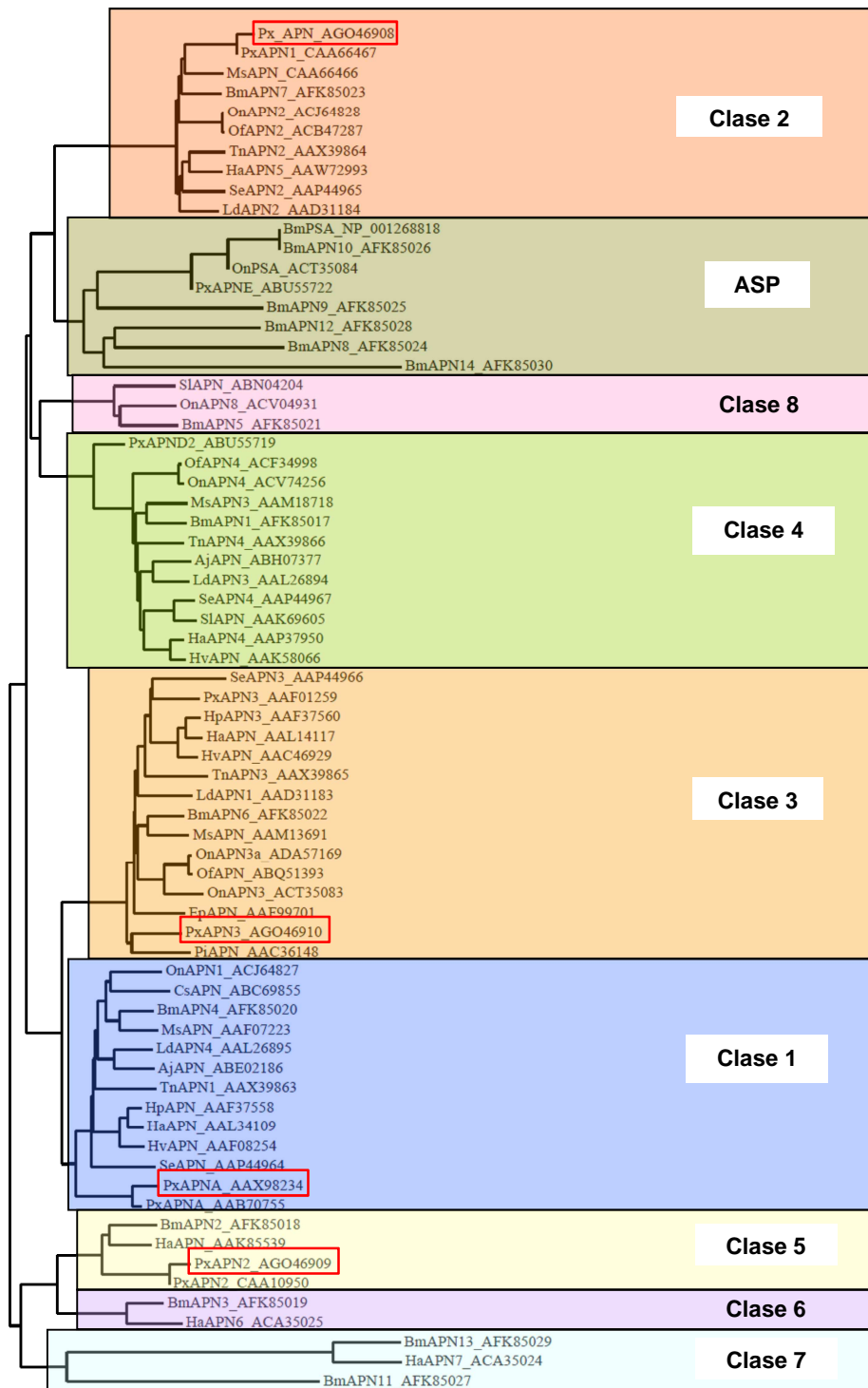
Todas las clases, excepto las 6, 7 y 8, incluían una secuencia aminopeptidasa de *P. xylostella*. Las nuevas secuencias de *P. xylostella* PxAPN-D2 y PxAPN-E fueron agrupadas en las clases 4 y ASP, respectivamente (**Fig. 37**), sin embargo, la PxAPN-G no pudo ser incluida en ninguna de las 8 clases descritas, de hecho, a través de un análisis BLASTp se pudo definir que presentaba una elevada similitud con la OnAPN5, que tampoco pudo ser incluida dentro de ninguna de las clases definidas por Crava *et al.* (2010).

De las secuencias de *B. mori* incluidas en el análisis filogenético se observó la presencia de algunas de ellas en las clases ya definidas por los árboles

filogenéticos más recientes (Crava *et al.*, 2010, Hughes, 2014). El resto de secuencias de *B. mori* no contempladas en estos trabajos fueron agrupadas en las clases de ASP y 7, estando agrupadas en la clase ASP las aminopeptidasas BmAPN8, 9, 12 y 14, y en la segunda clase la aminopeptidasa BmAPN11 (Fig. 37).

Las secuencias genómicas parciales obtenidas en la presente tesis PxAPN1\*, PxAPN2\*, PxAPN3\* y PxAPNA\* se encontraban en el mismo grupo que sus respectivas secuencias publicadas. Sin embargo, la secuencia PxAPN3\* presentó una relación filogenética mucho más estrecha con la PiAPN de *Plodia interpunctella* (Fig. 37) que con la secuencia PxAPN3 publicada de *P. xylostella* presentando ambas secuencias un porcentaje de similaridad del 65%. Este hecho se suma a que nuestra secuencia genómica parcial PxAPN3\* presentaba mayor similitud con otra aminopeptidasa 3 de *P. xylostella* publicada, la PxAPN3R (similitud del 100%), que con la PxAPN3 propiamente dicha (con una similitud del 56%).

Al analizar la nomenclatura seguida por los diferentes autores para la publicación de las aminopeptidasas se observa que no siempre se corresponde la numeración con la clase filogenética obtenida. Por ejemplo, en *P. xylostella* la PxAPN1 se sitúa en la clase 2, en *L. dispar* la LdAPN1 se agrupa en la clase 3 y la LdAPN3 en la clase 4, y en *B. mori* el número que determina a cada una de las aminopeptidasas no se correlaciona con ninguna de las clases a las que pertenecen. Esta situación resulta confusa a la hora de tratar y analizar las secuencias aminopeptidíticas en cualquier tipo de trabajo.



0.6

(Continua en la página siguiente)

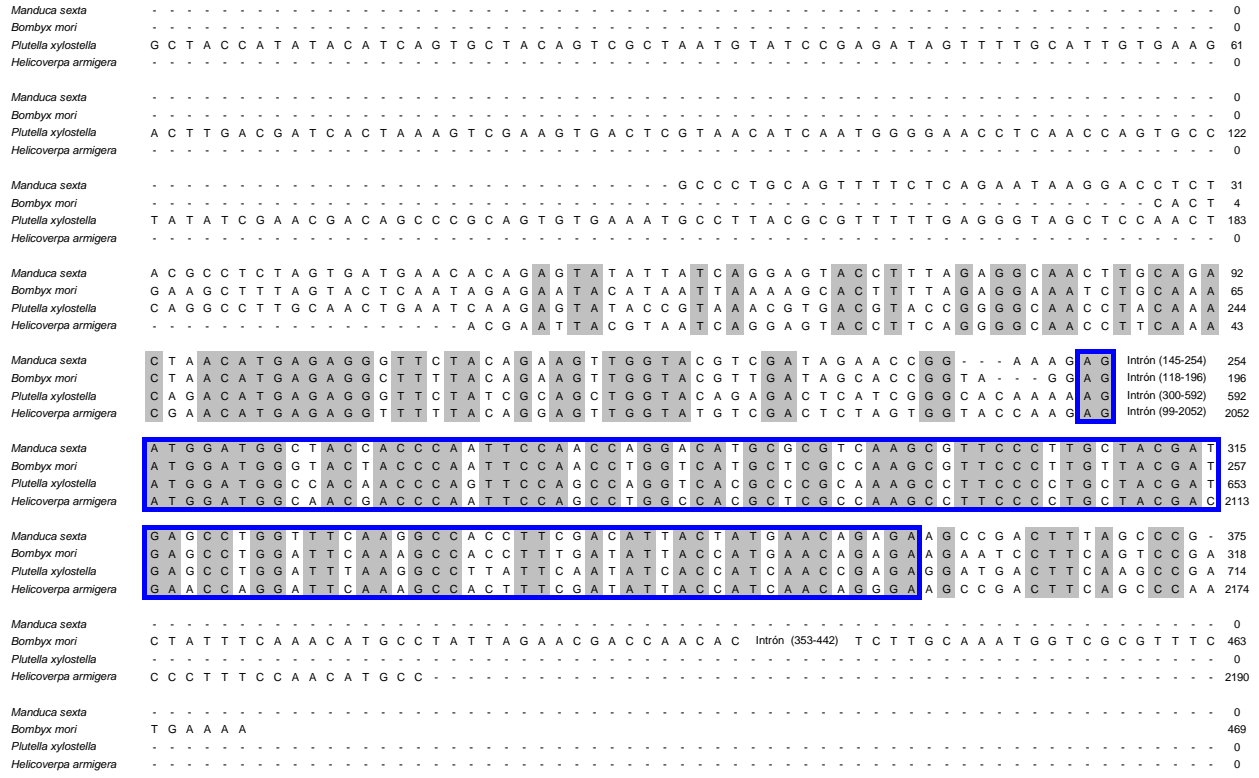




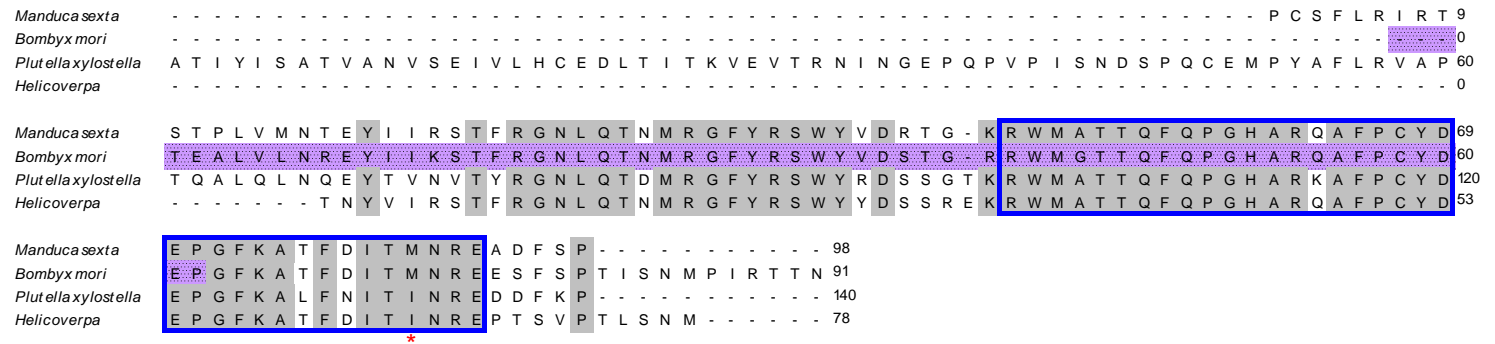
**Figura 37. Árbol filogenético construido a través del método de distancia Neighbor-joining mediante el uso del alineamiento COBALT de 70 secuencias de aminoácidos de aminopeptidasas N de 16 especies distintas de lepidópteros.** Se definen ocho clases de APN y una que contiene aminopeptidasas sensibles a la puromicina (ASP). Mediante recuadros rojos se señalan las secuencias, en aminoácidos, de las aminopeptidasas de *P. xylostella* obtenidas en el presente trabajo. En cada una de las secuencias se muestra su número de acceso al GenBank, así como los nombres de las especies de forma abreviada: Bm: *Bombyx mori*, Ms: *Manduca sexta*, On: *Ostrinia nubilalis*, Of: *Ostrinia furnacalis*, Tn: *Trichoplusia ni*, Ha: *Helicoverpa armigera*, Hv: *Heliothis virescens*, Se: *Spodoptera exigua*, Ld: *Lymantria dispar*, Px: *Plutella xylostella*, Ep: *Epiplatys postvittiana*, Hp: *Helicoverpa punctigera*, Pi: *Plodia interpunctella*, Cs: *Chilo suppressalis*, Aj: *Achea janata*, Sl: *Spodoptera litura*.

#### **1.4. Aparición de una región conservada entre diferentes aminopeptidasas**

El alineamiento múltiple de todas las secuencias obtenidas hasta el momento de *M. sexta*, *P. xylostella*, *H. armigera* y *B. mori* destacó la presencia de una región que se conservaba únicamente entre las secuencias MsAPN1, PxAPNA, HaAPN1 y BmAPN. Esta región se situaba adyacente al intrón descrito anteriormente en estas secuencias (**Fig. 38-Fig. 39**) y presentaba unos valores de similitud del 84% y del 98% al ser traducida a aminoácidos. Se consideró que podía tratarse de un motivo conservado consenso entre estas secuencias de aminopeptidasas, ya que tras ser analizado empleando la base de datos SMART quedaba definido como un dominio propio de la familia de las peptidasas M1. Este motivo se situaba entre las posiciones 592 y 628 de la secuencia genómica MsAPN1.



**FIGURA 38. Alineamiento de las secuencias de APN1 de *Manduca sexta* (AY927235), APN de *Bombyx mori* (AY928010), APNA de *Plutella xylostella* (AY928011) y APN1 de *Helicoverpa armigera* (AY928012).** Se reencuadra en azul el motivo conservado. Las posiciones de los nucleótidos se indican a la derecha, éstas incluyen la inserción del intrón. En gris se marcan los residuos nucleotídicos más conservados entre las cuatro secuencias. La primera base de cada secuencia se corresponde con la posición 297 de la APN1 de *M. sexta* (X89081), la 418 de la APN *B. mori* (AB007038), la 252 de la APNA de *P. xylostella*



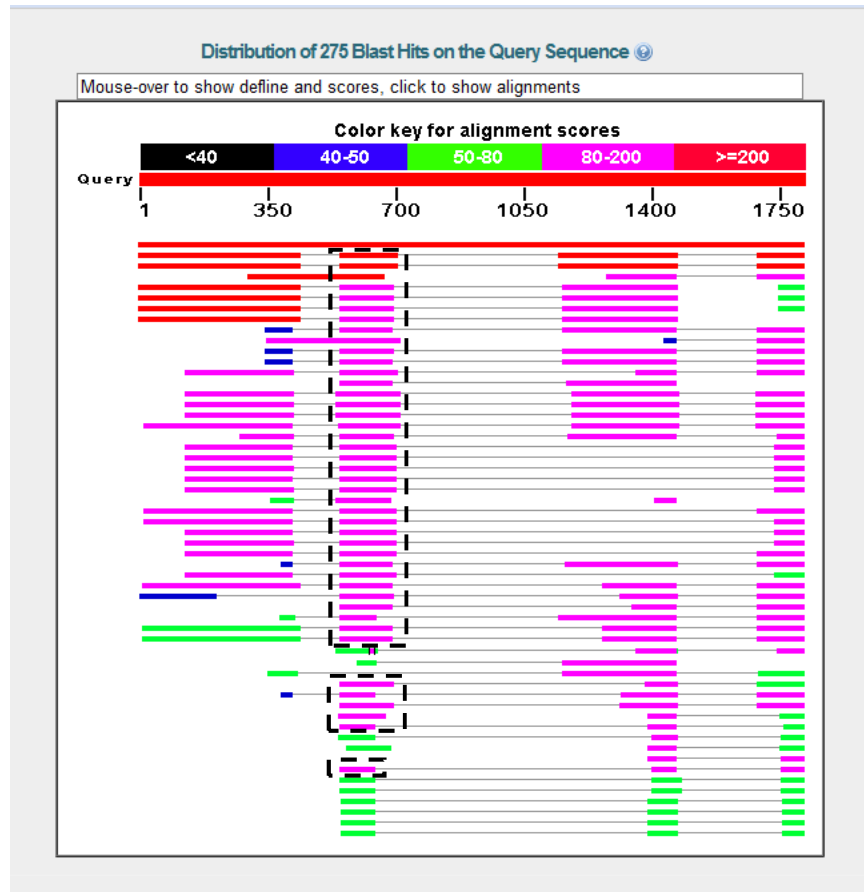
**FIGURA 39. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *Manduca sexta* (AAY16445), APN de *Bombyx mori* (AAX98233), APNA de *Plutella xylostella* (AAX98234) y APN1 de *Helicoverpa armigera* (AAX98235). El motivo conservado queda reencuadrado en azul. En gris se marcan los residuos aminoacídicos más conservados entre las cuatro secuencias. El asterisco indica cuando los residuos aminoacídicos de una misma posición pertenecen al mismo grupo de aminoácidos. Los residuos marcados en violeta son los que están incluidos en la región de unión de la toxina Cry1Aa según el estudio publicado por Yaoi *et al.* (1999). El primer aminoácido de cada secuencia se corresponde con la posición 127 de la APN1 de *M. sexta* (CAA61452), con la 140 de la APN1 *B. mori* (BAA32475), 82 de la APNA de *P. xylostella* (AAB70755) y la 141 de la APN1 de *H. armigera* (AAQ57405).**

Para conocer si más secuencias aminopeptídicas de la base de datos GenBank presentaban este motivo conservado, se tomó la secuencia genómica de la APN1 de *M. sexta* (AB007039) y se llevó a cabo un análisis BLASTn obteniendo los resultados que se muestran en la **figura 40** y en la **tabla 14** para secuencias con una puntuación >80 y un e-valor <1·10<sup>-11</sup>. Se observó que el motivo conservado no solo aparecía en las secuencias hasta ahora analizadas de PxAPNA, HaAPN1 y BmAPN, sino que también estaba presente en todas las secuencias aminopeptídicas pertenecientes a la Clase 1 (**Fig. 37**) junto con otras, no incluidas en esta clase, debido a que no se tomaron en cuenta en el análisis filogenético; tales secuencias fueron las siguientes: la AbR-APN1 de *Ostrinia furnacalis* (OfAPN1), la APN1 de *Diatraea saccharalis* (DsAPN), la APN de *Danaus plexippus* (DpAPN1) y la APN8 de *Mamestra configurata* (McAPN8). Al alinear el motivo conservado de todas las secuencias de la **tabla 14**, se obtuvieron unos valores de similitud del 85% y del 96% tras su traducción a aminoácidos. Se consideró pues, que todas estas secuencias eran ortólogas entre ellas.

Del análisis mediante BLASTp con el motivo conservado traducido a aminoácidos se obtuvieron las mismas secuencias que con el análisis BLASTn exceptuando los casos de *Epiphyas postvittana*, *L. dispar* (LdAPN) y *D. plexippus*. La secuencia de APN de *E. postvittana* no apareció en el análisis BLASTp por lo que se descartó como parte del conjunto de aminopeptidasas con el motivo conservado. Los casos de LdAPN y de DpAPN fueron secuencias que al ser traducidas presentaron una elevada homología con el resto de secuencias ortólogas a través del motivo conservado, es por ello que se incluyeron en la Clase 1 de aminopeptidasas N.

Ante tales resultados se considera que el motivo conservado podría estar determinando una serie de secuencias de aminopeptidasa N ortólogas entre ellas y pertenecientes a la Clase 1. Esta clase estaría constituida por las secuencias: MsAPN120 (AAF07223), BmAPN4 (AFK85020), OnAPN1 (ACJ64827), HvAPN (AAF08254), HpAPN1 (AAF37558), HaAPN1 (AAL34109),

CsAPN (ABC69855), TnAPN1 (AAX39863), AjAPN (ABE02186), SeAPN1 (AAP44964), PXAPNA (AAB70755), OfAPN1 (ACX85726), DsAPN1 (ADL38968), DpAPN1 (EHJ64338) y McAPN8 (AEA76302).



**FIGURA 40.** Resultado del análisis con BLASTn utilizando como secuencia modelo la APN de *M. sexta* (MsAPN) (AB007039). Los colores representan el nivel de puntuación (*score*), según el patrón seguido por el BLASTn, de cada una de las secuencias con la secuencia de búsqueda. El motivo conservado se reencuadra con líneas discontinuas. Se puede observar como, en las secuencias más completas, el motivo conservado se encuentra situado en una posición adyacente a un posible intrón.

**TABLA 14. Resultados obtenidos tras el análisis BLASTn utilizando como secuencia modelo MsAPN (AB007039).** Se muestran únicamente las secuencias con una puntuación >80 y e-valor <1·10<sup>-11</sup>. El orden de las secuencias en esta tabla es el seguido por las secuencias con el motivo conservado de la figura 40. En azul de destacan las secuencias de aminopeptidasa N incluidas en la Clase 1 de la figura 37.

Secuencias BLASTn		Nº acceso GenBank	
Nº de secuencia	Aminopeptidasa N	Secuencia nucleótidos	Secuencia aminoácidos
1	<i>Manduca sexta</i> APN	AB007039	BAA32476
2	<i>Manduca sexta</i> APN	X89081	CAA61452
3	<i>Manduca sexta</i> APN120	AF123313	AAF07223
4	<i>Manduca sexta</i> APN	AY927235	AAY16445
5	<i>Bombyx mori</i> APN4	JQ061146	AFK85020
6	<i>Bombyx mori</i> mRNA, clone: fmgV05D09	AK378144	
7	<i>Bombyx mori</i> APN1	NM_001043548	NP_001037013
8	<i>Bombyx mori</i> APN	AB007038	BAA32475
9	<i>Ostrinia nubilalis</i> APN1	EU878375	ACJ64827
10	<i>Bombyx mori</i> APN	AY928010	AAX98233
11	<i>Ostrinia furnacalis</i> BtS-APN1	GQ927480	ACX85727
12	<i>Ostrinia furnacalis</i> AbR-APN1	GQ927479	ACX85726
13	<i>Heliothis virescens</i> Cry1A toxin receptor A	AF173552	AAF08254
14	<i>Diatraea saccharalis</i> APN1	HM231316	ADL38968
15	80K05_HaBAC_fin, <i>Helicoverpa armigera</i> BAC, pupae DNA	FP340434	
16	64G08_HaBAC_fin, <i>Helicoverpa armigera</i> BAC, pupae DNA	FP340425	
17	11C07_HaBAC_fin, <i>Helicoverpa armigera</i> BAC, pupae DNA	FP340421	
18	31C13_HaBAC_fin, <i>Helicoverpa armigera</i> BAC, pupae DNA	FP340430	
19	<i>Helicoverpa punctigera</i> APN1	AF217248	AAF37558

(Continúa en la página siguiente)

20	<i>Helicoverpa armigera</i> strain SUS-G APN1	AY515310	AAS00451
21	<i>Helicoverpa armigera</i> strain NIL4-RES-Ac APN1	AY515309	AAS00450
22	<i>Helicoverpa armigera</i> APN1	AY358034	AAQ57405
23	<i>Helicoverpa armigera</i> APN1	AF521659	AAN75693
24	<i>Helicoverpa armigera</i> APN1	AY038607	AAK85538
25	<i>Helicoverpa armigera</i> APN	AY928012	AAX98235
26	<i>Helicoverpa armigera</i> Bt- Cry1Ac resistance strain APN1	EU568874	ACC68683
27	<i>Helicoverpa armigera</i> Bt- Cry1Ac susceptible strain APN1	EU568875	ACC68682
28	<i>Helicoverpa armigera</i> APN1	AY437833	AAR20814
29	<i>Helicoverpa armigera</i> APN1	AY358035	AAQ57406
30	<i>Helicoverpa armigera</i> strain Rm APN1	AF441377	AAL34109
31	<i>Chilo suppressalis</i> APN	DQ342305	ABC69855
32	<i>Helicoverpa armigera</i> APN1	AY437832	AAR20813
33	<i>Achaea janata</i> APN	KF537663	AHA90590
34	<i>Plutella xylostella</i> clone APN1R	GU213039	ADA59491
35	<i>Mamestra configurata</i> APN8	HM357836	AEA76302
36	<i>Trichoplusia ni</i> APN1	AY836579	AAX39863
37	<i>Achaea janata</i> APN	KF537664	AHA90591
38	<i>Achaea janata</i> APN	DQ444715	ABE02186
39	<i>Plutella xylostella</i> APN1S	GU213040	ADA59492
40	<i>Spodoptera exigua</i> APN1	AY218842	AAP44964
41	<i>Plutella xylostella</i> PxAPN-A	AF020389	AAB70755
42	<i>Plutella xylostella</i> APN	AY928011	AAX98234
43	<i>Manduca sexta</i> APN4	AY095259	AAM13691
44	<i>Epiphyas postvittana</i> APN	AF276241	AAF99701

## 2. BÚSQUEDA DE MARCADORES GENÉTICOS Y ESTUDIOS DE LIGAMIENTO CON *Plutella xylostella*

### 2.1 Marcadores genéticos

#### 2.1.1 Aminopeptidasas como marcadores genéticos

##### 2.1.1.1 Aminopeptidasas en la colonia susceptible LAB-PS

Tras determinar la presencia de regiones intrónicas en las secuencias PxAPN1, PxAPN2, PxAPN3 y PxAPNA de *P. xylostella* cabía la posibilidad de que pudieran presentar cierta variabilidad en cuanto a su tamaño, lo que se traduciría en un polimorfismo de tamaño útil para futuros estudios de ligamento genético. De esta forma, se genotiparon 53 individuos de la colonia LAB-PS mediante la amplificación de estas cuatro aminopeptidasas. Los resultados fueron positivos pues las bandas de amplificación mostraban un polimorfismo relacionado con el tamaño de los intrones, aunque también podría ser resultado de la inserción de nuevas regiones intrónicas (Tabla 15). Se secuenciaron todas las bandas obtenidas pero no de forma completa, pues el objetivo era determinar qué bandas eran específicas y, por tanto, de interés para el estudio. También aparecieron casos en los que no se obtuvo ningún amplificado, posiblemente como consecuencia de cambios nucleotídicos capaces de impedir la correcta hibridación de los cebadores. Añadir que ninguno de los casos parecía encontrarse en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el caso de la PxAPN1\* se amplificaron dos bandas muy definidas, una de unas 1500 pb y otra de 842 pb. La primera fue parcialmente secuenciada para comprobar que se correspondía con la PxAPN1, la segunda se correspondía con la descrita en el apartado 1.1. La aparición del primer alelo en los 53 individuos fue prácticamente el doble que la del segundo. Todos los individuos resultaron ser homocigotos para cada uno de estos dos amplificados (Tabla 15).



En cuanto a la P<sub>x</sub>APN2\* se amplificaron dos tipos de bandas, la de 1333 pb y otra de un tamaño aproximado de 1200 pb (también parcialmente secuenciada para comprobar su identidad). En este caso se dio la situación de que en un 13% de los individuos analizados no se pudo obtener ningún tipo de amplificado, lo que denominamos como alelo nulo (**Tabla 15**). Con el ADN de este 13% de individuos no se tuvo dificultad alguna en poder conseguir amplificadas con el resto de aminopeptidasas, por lo que se consideró que el material genético no tenía ningún problema. En cuanto a la frecuencia de aparición de los alelos, la presencia del segundo alelo superaba en más del doble al primero, siendo el alelo nulo el menos representado de los tres (**Tabla 15**). Prácticamente la mitad de los individuos eran homocigotos para el alelo de 1200 pb, siendo el de 1333 pb el que menor porcentaje de presencia entre los individuos. Indicar que los porcentajes de homocigotos podían incluir la presencia de individuos heterocigotos con presencia del alelo nulo. Los individuos heterocigotos con ambos alelos representaban el 34% de los individuos analizados.

La P<sub>x</sub>APN3\* quedaría representada únicamente por el amplificado de 711 pb en todos los individuos, siendo todos ellos homocigotos (**Tabla 15**). En este caso, esta P<sub>x</sub>APN3\* no sería de utilidad para un estudio de ligamiento debido a la ausencia de polimorfismo.

Finalmente, la P<sub>x</sub>APNA\* quedaba representada por dos bandas, la secuenciada de 745 pb y otra de un tamaño aproximado de 900 pb. En este caso la mayoría de casos correspondían a individuos homocigotos del alelo de 745 pb y heterocigotos con ambos alelos, solo hubo un caso que se correspondió con un homocigoto para el alelo de 900 pb (**Tabla 15**).

**TABLA 15. Frecuencia de los alelos y genotipos encontrados de las cuatro aminopeptidasas en 53 individuos de la colonia LAB-PS. La ausencia del amplificado se denomina en la tabla como alelo nulo. n representa el número de individuos.**

Gen	Alelos			Genotipado	
	pb	alelo	n	Genotipo	n (%)
<i>px apn1</i>	1500	a	18	aa	18 (34)
	842	b	35	bb	35 (66)
<i>px apn2</i>	1333	a	19	aa*	1 (2)
	1200	b	45	bb*	27 (51)
	nulo	c	7	cc	7 (13)
				ab	18 (34)
<i>px apn3</i>	711	a	53	aa	53 (100)
<i>px apnA</i>	900	a	21	aa	1 (2)
	745	b	46	bb	32 (60)
				ab	20 (38)

\*La frecuencia de los genotipos homocigotos aa y bb incluye los heterocigotos ac y bc, respectivamente.

### 2.1.1.2 Aminopeptidasas en la cepa resistente SEL-B

Se amplificó la PxAPN1, PxAPN2, PxAPN3 y PxAPNA en la cepa resistente de *P. xylostella* SEL-B empleando los mismos cebadores que en el caso de su amplificación en LAB-PS. Se obtuvieron diferentes resultados en función del caso. Igual que sucedía con individuos de LAB-PS parece que ningún de los casos parecía encontrarse en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En individuos de la cepa SEL-B se determinó un patrón de amplificadas de la PxAPN1 distinto al visto en individuos de LAB-PS, puesto que, además de los de 842 pb y 1500 pb, se encontró un amplificado adicional de 400 pb. Por secuenciación se comprobó que este alelo se correspondía a la región amplificada de la PxAPN1\* (apartado 1.1) pero con la ausencia del intrón descrito (**Fig. 33**). De los 44 individuos analizados de la cepa SEL-B, la gran mayoría presentaban el alelo de 842 pb, seguido por el nuevo alelo de 400 pb y por el de 1500 pb (**Tabla 16**). En cuanto a los genotipos, *a priori*, el más representado fue el homocigoto del alelo de 842 pb. De los heterocigotos únicamente fueron observados individuos con los alelos de 842 y 400 pb (**Tabla 16**).

Con la amplificación de la PxAPN2\* se encontraron los mismos alelos que en LAB-PS, aunque en este caso la representación entre los individuos difería considerablemente, pues la mayoría de individuos presentaron el alelo nulo, estando el resto de los alelos muy poco representados (**Tabla 16**). Por ello, en el genotipado la mayoría de individuos fueron homocigotos para este alelo (**Tabla 16**).

En cuanto a la PxAPN3\* no se pudo amplificar en ninguno de los 44 individuos de la cepa SEL-B, a pesar de emplear diferentes condiciones de PCR, así como con Taq polimerasas mucho mayor poder de procesado y con corrección de errores.

La PxAPNA\* quedaba representada por los mismos alelos vistos para esta misma aminopeptidasa en LAB-PS. Sin embargo, difirió de ésta en cuanto a la proporción de los mismos entre los individuos, puesto que el 100% presentaron ambos alelos, el de 900 y 745 pb. De esta forma, no se encontraron individuos homocigotos (Tabla 16).

**TABLA 16. Frecuencia de los alelos y genotipos encontrados de tres aminopeptidasas en 44 individuos de la población SEL-B.** La ausencia del amplificado se denomina en la tabla como alelo nulo. n representa el número de individuos.

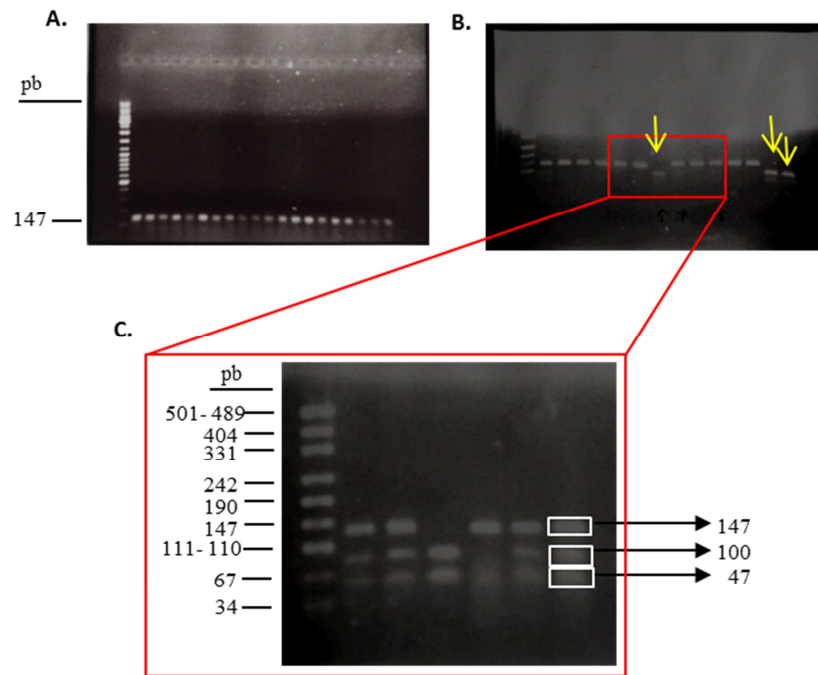
Gen	Alelos			Genotipado	
	pb	alelo	n	Genotipo	n (%)
<i>px apn1</i>				aa	1 (2)
	1500	a	1	bb	28 (64)
	842	b	34	cc	9 (20)
	400	c	15	ab	0
				ac	0
				bc	6 (14)
<i>px apn2</i>	1333	a	13	aa*	8 (19)
	1200	b	5	bb	0
	nulo	c	31	cc	31 (70)
				ab	5 (11)
<i>px apnA</i>	900	a	44	aa	0
	745	b	44	bb	0
				ab	44 (100)

\*La frecuencia de los genotipos homocigotos aa incluye los heterocigotos con presencia del alelo nulo.

### 2.1.2 Caderina como marcador genético en LAB-PS y SEL-B

A partir de los cebadores diseñados (apartado 5.1.2 de Material y Métodos) se obtuvo un amplificado de unas 147 pb en 30 individuos de la colonia susceptible LAB-PS y en 21 individuos de la cepa SEL-B. Este amplificado se correspondía con la caderina publicada. En ninguno de ellos se observó ningún tipo de polimorfismo de tamaño pues todos presentaban el mismo fragmento de 147 pb (**Fig. 41A**). Al tener como objetivo encontrar algún tipo de variabilidad con el fin de poder utilizar la caderina como marcador molecular en estudios de ligamiento, se procedió a analizar los posibles cambios de nucleótidos (que no se tradujeran en cambios de tipo de aminoácido) que pudieran contener cada uno de los amplificados obtenidos, con el propósito de poder encontrar una diana de corte para un enzima de restricción. Con este sistema de análisis se localizó un cambio nucleotídico de interés, correspondiente con la diana CCT(A)GG, punto de corte del enzima de restricción *Mva*I. Este punto se situaba en la posición 177 de la secuencia de caderina de *P. xylostella* publicada y de la posición 56 de la secuencia de caderina amplificada en los individuos LAB-PS y SEL-B.

Se tomaron los 30 y 21 amplificados de caderina obtenidos y se procedió a su digestión con el enzima *Mva*I. Tras el análisis por electroforesis con gel de agarosa se observó que se había conseguido el polimorfismo buscado, en este caso de alelos codominantes con tres genotipos distintos: individuos homocigotos de ausencia del punto de restricción (AA), por lo que únicamente presentaban la banda de 147 pb; individuos homocigotos (BB) para la presencia del punto de restricción, esto es, con presencia de las dos bandas, una de 100 pb y otra de 47 pb; y finalmente, individuos heterocigotos (AB) presentando los tres tipos de bandas (**Fig. 41**). En los individuos LAB-PS la frecuencia del genotipo heterocigoto (AB) fue mayor que en el resto; sin embargo, el genotipo mayoritario para los individuos SEL-B fue el homocigoto BB, quedando muy poco representado el genotipo AA (**Tabla 17**).



**FIGURA 41. Electroforesis en geles de agarosa al 2% del resultado de la amplificación de la caderina.** (A) Amplificados de 147 pb de la caderina a partir de individuos de la colonia susceptible LAB-PS. (B) Producto de la digestión con el enzima de restricción *MvaI*. Mediante flechas se indican los tres individuos homocigotos para el punto de corte, el resto serían heterocigotos. (C) Detalle de los casos homocigotos y heterocigotos. El marcador de pesos moleculares es el pUC19 Marker 23 (Fermentas GmbH)

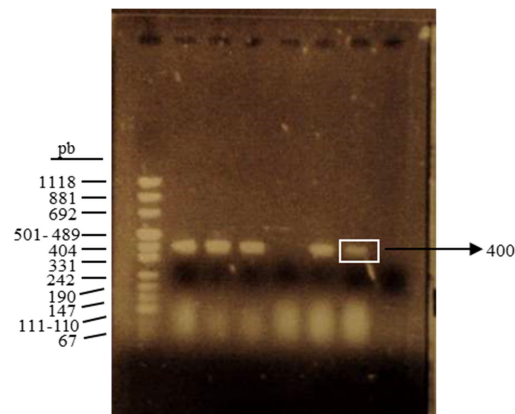
**TABLA 17. Frecuencia de los genotipos encontrados para el marcador genético de la caderina.** Se analizaron 30 individuos de la colonia LAB-PS y 21 de la cepa SEL-B. n representa el número de individuos.

Cepa	Genotipo	n (%)
LAB-PS	AA	7 (23)
	BB	3 (10)
	AB	20 (67)
SEL-B	BB	19 (90)
	AB	2 (10)

### 2.1.3 Marcador molecular STS

Este marcador de 776 pb, ligado a un gen desconocido de la resistencia en *P. xylostella* (Heckel *et al.* 1999), se intentó amplificar mediante los cebadores publicados por el grupo de Heckel *et al.* (1999) P1-L y P2-R, pero no se obtuvieron resultados positivos. El objetivo perseguido con este marcador era conseguir el polimorfismo adecuado con el fin de poder llevar estudios de ligamiento con marcadores moleculares de genes candidatos a la resistencia. Se diseñaron otro par de cebadores (Heckel-L y -R) con los que sí se consiguió obtener un amplificado de 400 pb, pero que no presentó ningún tipo de polimorfismo tras el análisis en 33 individuos de la colonia LAB-PS y de 40 de la cepa SEL-B. Así pues, continuando con la búsqueda de un determinado polimorfismo se llevó a cabo una combinación de los cebadores comentados anteriormente (P1-L y Heckel-R) con el fin de abarcar mayor secuencia del fragmento STS (Tabla 11-Fig. 28). El resultado fue la obtención de un amplificado de 700 pb único en todos los individuos analizados (tanto de LAB-PS como de SEL-B) por lo que, dado su carácter monomórfico, tampoco fue de utilidad para un análisis de ligamiento.

Ante estos resultados, se alinearon todas las secuencias obtenidas hasta el momento con el fin de averiguar si existían o no, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*). La estrategia a seguir se basaría en el diseño de cebadores que pudieran unirse a un porcentaje limitado de individuos dentro de una misma muestra, y con ello conseguir variabilidad en la amplificación del fragmento (apartado 5.1.3 de Material y Métodos). De esta forma sí se consiguió obtener la variabilidad buscada pues se obtuvo un amplificado de unas 400 pb de carácter dominante, pues del análisis de todos los individuos analizados de LAB-PS y SEL-B se obtuvo como resultado la presencia y ausencia del mismo (Fig. 42). De los 33 individuos de *P. xylostella* LAB-PS el 77% presentaban la banda y el 23% restante no. En el caso de los 40 individuos de la cepa SEL-B predominaba la ausencia de amplificado, representado por un 68% de los individuos.



**FIGURA 42. Marcador molecular STS en individuos de la colonia LAB-PS de *P. xylostella*.** Electroforesis con gel de agarosa al 2% donde se observan los dos alelos del fragmento STS, presencia/ausencia del amplificado de 400 pb. Marcador de pesos moleculares: pUC Mix Marker 8 (Fermentas GmbH)



## 2.2 Estudios de ligamiento

### 2.2.1 Estudios de ligamiento entre las aminopeptidasas

Con el polimorfismo encontrado tras el análisis de la estructura genómica de las PxAPN1\*, PxAPN2\* y PxAPNA\* de *P. xylostella*, se estudió la forma en la que se podían transmitir a través de las diferentes generaciones de una misma familia. La PxAPN3\* no se analizó debido al carácter monomórfico que presentaba.

Así pues, se elaboraron diferentes familias de dos generaciones (generaciones P y F1) mediante el cruce de individuos de la colonia LAB-PS. De ellas, seis familias fueron informativas permitiendo ver como la herencia de los alelos de estudio entre las generaciones P y F1 se daba de forma mendeliana. Tras el genotipado de todos los individuos de las seis familias y posterior análisis con el programa LINKAGE 5.2, se obtuvo como resultado que la herencia no estaba ligada al sexo y que los valores de LodScore eran positivos indicando la existencia de cierto ligamiento entre las tres aminopeptidasas; sin embargo, al ser valores que no aseguraban el ligamiento ( $< 3$ ), fueron considerados como una primera aproximación con el material biológico del que se disponía, teniendo en cuenta la necesidad de disponer un mayor número de datos procedentes de nuevas familias.

### 2.2.2 Estudio de ligamiento entre el marcador molecular STS y las aminopeptidasas

El genotipado y análisis de cinco de las seis mismas familias anteriores (una de ellas no resultó ser informativa por presentar el fragmento amplificado en todos los individuos) mostraron unos valores de LodScore negativos, aunque próximos al valor 0, sugiriendo que las PxAPN1, PxAPN2 y PxAPNA no se encontraban ligadas al marcador molecular STS.

## BLOQUE II. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN *Plutella xylostella*

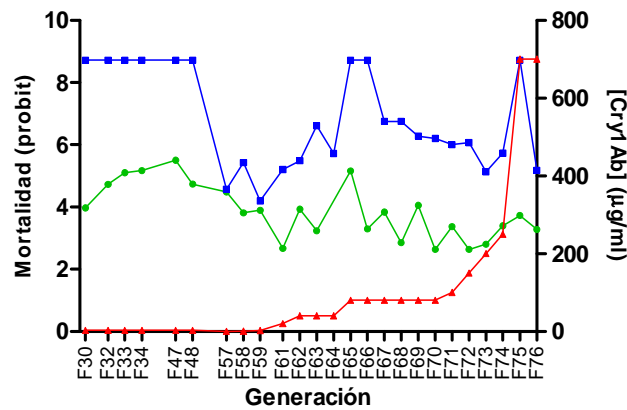
### 1. EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA DE LA CEPA SEL-B

#### 1.1 Selección y caracterización toxicológica de la cepa SEL-B

La selección de la cepa SEL-B fue discontinua durante 2 años desde la publicación de los últimos resultados (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001a). La selección de esta cepa fue retomada a partir de la generación número 30 partiendo de una concentración inicial de 3 µg/ml de una mezcla de esporas y cristales de Cry1Ab obteniéndose un valor de mortalidad de 4 unidades Probit (Fig. 43). El control fue realizado tomando como cepa susceptible la LAB-PS la cual, a esta misma concentración de Cry1Ab, presentó una mortalidad de 9 unidades Probit.

Seguidamente transcurrieron dos espacios de tiempo sin presión de selección debido a la limitada disponibilidad de individuos en aquellos momentos. Estas franjas de tiempo estaban comprendidas entre las generaciones F35-F46 y entre F49-F56, transcurriendo alrededor de un año y nueve meses, respectivamente (Tabla 18). En la generación F47 se continuaron observando los mismos valores de mortalidad que los obtenidos en la generación F34, alrededor de 4 unidades Probit (Fig. 43). Sin embargo, a partir de la generación F57 se observó que, aunque los niveles de resistencia se mantenían en SEL-B, la cepa control LAB-PS tomaba valores comparables a los de la cepa SEL-B mermando aparentemente su carácter susceptible. Esta disminución coincidía en el punto en el que la cepa SEL-B era de nuevo reselectionada tras un tiempo sin presión de selección (Fig. 43). En este sentido, y con el fin de recuperar los perfiles de susceptibilidad en LAB-PS y mantener los de resistencia en SEL-B, se consideró continuar con la presión de selección pero con concentraciones mayores de toxina Cry1Ab empleando pues toxina activada (2 µg/ml) (Tabla 18). Con ello, la colonia LAB-PS recuperó los niveles

iniciales de susceptibilidad durante las generaciones F65 y F66. Sin embargo, esta tendencia fue interrumpida en las siguientes generaciones a pesar de continuar incrementando las dosis de toxina Cry1Ab (**Fig. 43**). Esta dinámica fue vista en repetidas ocasiones, incluso mostrando un perfil más susceptible tras ser sometida a concentraciones crecientes de Cry1Ab, sin embargo posteriormente, y tras pocas generaciones (F66 vs F67 o F75 vs F76), los niveles remitían de nuevo. En el caso de SEL-B los niveles de resistencia oscilaban entre generaciones pero se mantenían (**Fig. 43**).



**FIGURA 43.** Representación la mortalidad (en unidades Probit) de la cepa SEL-B (en color verde) y de la susceptible LAB-PS (en color azul) durante el proceso de selección con Cry1Ab. En rojo (eje derecho de ordenadas) se representa la dosis de Cry1Ab empleada.

**TABLA 18. Proceso de selección llevado a cabo en la cepa SEL-B con la toxina Cry1Ab.** Se detalla la fecha de selección, el número de larvas supervivientes tras el ensayo de selección, así como la dosis de toxina Cry1Ab empleada ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Generación	Fecha	Dosis de Cry1Ab	Nº de larvas
F30	10/03/2002	3	179
F32	12/04/2002	3	199
F33	02/05/2002	3	207
F34	23/05/2002	3	195
F47	19/04/2003	3	195
*F48	19/05/2003	3	199
F57	07/01/2004	0.36	201
F58	04/02/2004	1	194
F59	25/02/2004	2	209
F61	14/04/2004	20	198
F62	12/05/2004	40	217
F63	07/06/2004	40	179
F64	01/07/2004	40	355
F65	25/07/2004	80	272
F66	22/09/2004	80	225
F67	20/10/2004	80	334
F68	15/11/2004	80	317
F69	09/12/2004	80	323
F70	28/01/2005	80	427
F71	15/02/2005	100	406
F72	14/03/2005	150	321
F73	11/04/2005	200	370
F74	05/05/2005	250	261
F75	30/05/2005	700	293
F76	20/06/2005	700	420

(\*) Hasta la generación F48 se emplea una mezcla de esporas y cristales de Cry1Ab procedente de una cepa de *B. thuringiensis* recombinante (EG7077). Las generaciones restantes son seleccionadas con toxina Cry1Ab activa procedente de una cepa recombinante de *E. coli* (CG094-208)

## 1.2 Cálculo de la $CL_{50}$ para Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa

Los ensayos de mortalidad permitirían caracterizar mejor la resistencia de la cepa SEL-B frente Cry1Ab, pues al obtener los valores de la  $CL_{50}$  (así como los valores de las pendientes) se podrían realizar estudios comparativos con trabajos anteriores en los que ya habían empleado esta cepa (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001a). Los ensayos de mortalidad se llevaron a cabo en dos generaciones: la F67 y F72, las cuales estaban separadas entre ellas unos 5 meses y que se caracterizaban por situarse en dos períodos estables dentro del proceso de selección.

Se estudió con mayor profundidad el perfil de susceptibilidad de esta cepa también a través de las toxinas Cry1Ac y Cry1Fa con el fin de averiguar la posibilidad de aparición de resistencia cruzada entre ellas.

La toxina Cry1Ab mostró valores de  $CL_{50}$  15 veces superior a los obtenidos con las toxinas Cry1Ac y Cry1Fa en SEL-B frente LAB-PS (**Tabla 19**). Estas diferencias fueron significativas al comprobar que los límites de confianza ( $LC_{95}$ ) de los valores de  $LC_{50}$  no se solapaban entre sí. No se calculó la potencia relativa frente Cry1Ab puesto que las rectas de regresión no resultaron ser paralelas (p-valor <0.05) (**Fig. 44A**). Las pendientes de las rectas de regresión frente Cry1Ab también resultaron ser significativamente diferentes entre las dos cepas (p-valor<0.05) siendo mayor en SEL-B, indicando una mayor homogeneidad genética de esta cepa en cuanto a su respuesta frente Cry1Ab (**Fig. 44A-Tabla 19**). Contrariamente, la colonia LAB-PS se definía por presentar una respuesta mayoritariamente heterogénea frente a esta misma toxina (**Fig. 44A-Tabla 19**). El conjunto de estos resultados apuntaban a definir a la cepa SEL-B como resistente frente a la toxina Cry1Ab al compararla con la susceptible LAB-PS.

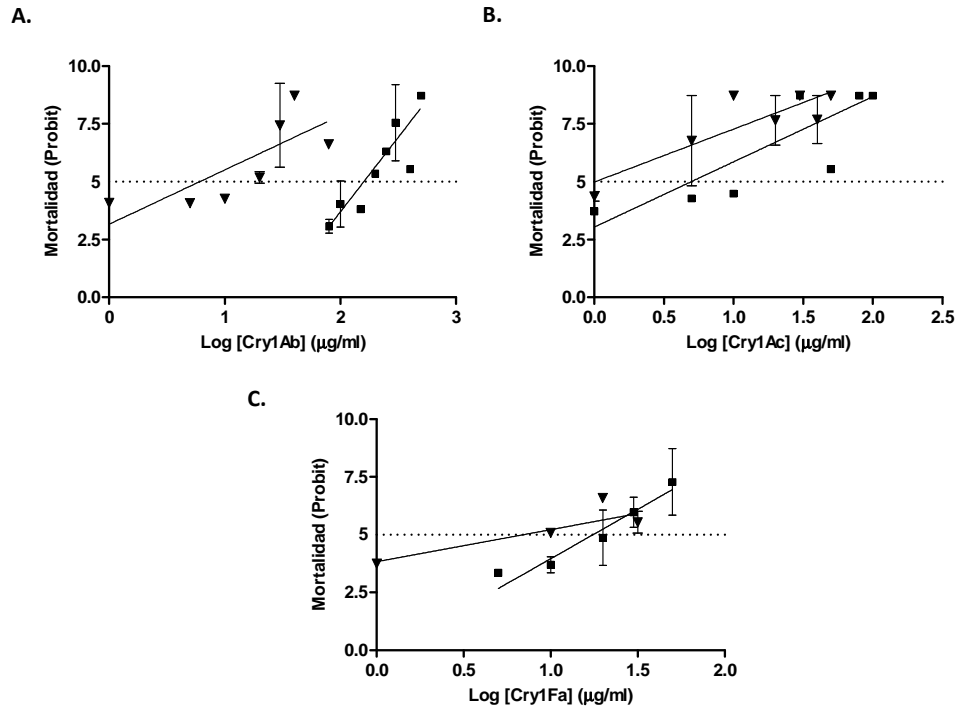


FIGURA 44. Respuesta dosis-mortalidad en larvas de *P. xylostella* de la cepa susceptible LAB-PS (▼) y de la resistente SEL-B (■) frente a las toxinas activas Cry1Ab (A), Cry1Ac (B) y Cry1Fa (C).

**TABLA 19. Valores de  $CL_{50}$  obtenidos en los ensayos de mortalidad con las toxinas activadas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa en la cepa resistente SEL-B y en la susceptible LAB-PS.** Los valores de  $CL_{50}$  y los límites de confianza al 95% ( $LC_{95}$ ) se expresan en  $\mu\text{g/ml}$ . n: número de individuos; gl: grados de libertad

Toxina	Cepa	n	$CL_{50}$ ( $LC_{95}$ )	Pendiente $\pm$ SE
<b>Cry1Ab</b>	LAB-PS	234	10.40 (3.67-20.09)	1.94 $\pm$ 0.24
	SEL-B	275	159.37 (112.83-228.54)	6.25 $\pm$ 0.63
<b>Cry1Ac</b>	LAB-PS	285	2.20 (0.83-3.85)	2.06 $\pm$ 0.25
	SEL-B	210	7.60 (2.06-16.22)	1.71 $\pm$ 0.24
<b>Cry1Fa</b>	LAB-PS	177	6.80 (4.12-19.95)	1.48 $\pm$ 0.57
	SEL-B	183	20.90 (17.98-24.31)	3.70 $\pm$ 0.50

Los valores de  $\chi^2$  de cada regresión no fueron significativos indicando que los datos se ajustaban al modelo de análisis probit.

Respecto a las toxinas Cry1Ac y Cry1Fa no se observaron diferencias significativas entre los valores  $LC_{50}$  de las cepas SEL-B y LAB-PS (Fig. 44B, C y Tabla 19). Las pendientes obtenidas de las rectas de regresión para la toxina Cry1Ac tampoco presentaron diferencias significativas entre ellas ( $p$ -valor $>$ 0.05); sin embargo, para la toxina Cry1Fa, la colonia LAB-PS fue genéticamente más heterogénea que SEL-B pues, en este caso, las pendientes sí fueron significativamente distintas ( $p$ -valor $<$ 0.05).

El conjunto de todos estos datos mostró que la respuesta de SEL-B frente las tres toxinas fue distinta, pues se caracterizó por ser resistente frente la toxina Cry1Ab y susceptible a las toxinas Cry1Ac y Cry1Fa, descartando pues la presencia de resistencia cruzada entre ambos conjuntos de toxinas.

## 2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA RESISTENCIA EN *P. xylostella*

### 2.1 Estudio de la herencia de la resistencia en la cepa SEL-B

La caracterización genética de la cepa SEL-B se realizó mediante una serie de cruces en masa entre combinaciones de individuos de diferente sexo procedentes de las cepas SEL-B y LAB-PS, determinando la mortalidad de la descendencia frente a las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa (apartado 4.2 de Material y Métodos).

Respecto a Cry1Ab (**Fig. 45A**) se observó que las generaciones F1 procedentes de ambos tipos de cruces de SEL-B se caracterizaron por presentar una herencia de la resistencia a Cry1Ab de tipo recesiva, pues la  $CL_{50}$  se situaba próxima a la de la cepa susceptible LAB-PS. Sin embargo, las pendientes obtenidas fueron distintas a las de los dos parentales indicando una mayor heterogeneidad genética en las generaciones filiales. Estas aportaciones fueron apoyadas por el análisis estadístico Probit (**Tabla 20**) mostrando que los valores de  $CL_{50}$  obtenidos de ambos tipos de cruces no eran significativamente diferentes a los de la cepa LAB-PS. Ello indicaba que, por una parte, tal como habíamos comentado antes, la herencia de la resistencia a Cry1Ab era de carácter recesiva, y por otra que no estaba influenciada por el sexo, pues las diferencias entre las  $CL_{50}$  de las generaciones F1 de ambos tipos de cruces tampoco resultaron ser significativas (**Tabla 20**). La determinación cuantitativa de la dominancia de la resistencia a Cry1Ab en la cepa SEL-B dio como resultado un valor de  $D_{CL} = 0.33$ , confirmando por tanto que la resistencia de SEL-B a Cry1Ab era de carácter recesivo.

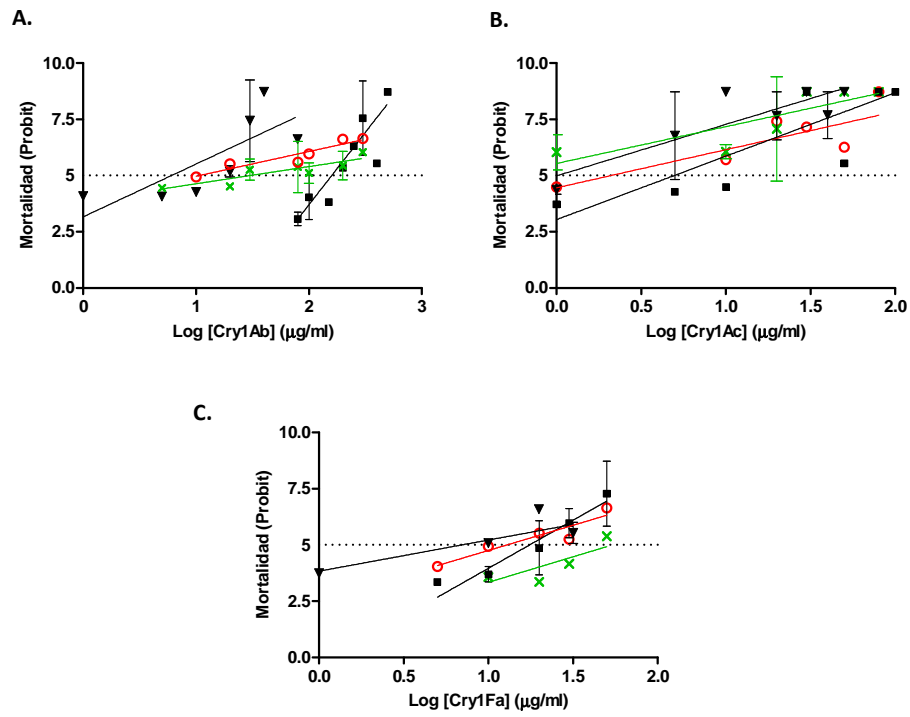
En cuanto a las pendientes, los valores obtenidos de las rectas de regresión de ambos tipos de cruces no fueron significativamente diferentes entre sí (p-valor >0.05), pero sí lo fueron frente a las obtenidas en los parentales



LAB-PS y SEL-B (p-valor <0.05) mostrando un grado de heterogeneidad genética entre los individuos de las F1.

La representación de los resultados de los ensayos de mortalidad con Cry1Ac (**Fig. 45B**) mostraron como las cuatro rectas de regresión eran similares entre sí. Estadísticamente las diferencias entre ellas no fueron significativas (p-valor <0.05), por tanto no existían diferencias entre sexos ni entre la generación F1 y los parentales (**Tabla 20**). Los valores de las pendientes de cada una de las rectas tampoco presentaron diferencias significativas entre ellas (p-valor <0.05). En conjunto todos estos resultados mostraron que las generaciones F1 heredaron la ausencia de resistencia de los parentales SEL-B y LAB-PS frente a la toxina Cry1Ac.

Los resultados de los ensayos con Cry1Fa (**Fig. 45C**) mostraron que los valores  $CL_{50}$  de ambos tipos de cruces no eran significativamente diferentes ni entre ellas ni frente las  $CL_{50}$  de los parentales (p-valor <0.05). Por ello, la generación F1 heredaba la susceptibilidad frente a esta toxina tal y como se daba en la generación parental. En relación a las pendientes, éstas no fueron significativamente diferentes (p-valor >0.05) entre la generación F1 de ambos tipos de cruces ni frente al parental LAB-PS, pero sí frente a la pendiente de la recta de regresión de SEL-B (**Tabla 20**).



**FIGURA 45.** Respuesta dosis-mortalidad frente a las toxinas activas Cry1Ab (A), Cry1Ac (B) y Cry1Fa (C) en larvas de *P. xylostella* procedentes de la cepa susceptible LAB-PS (▼) y de la resistente SEL-B (■), así como de la generación F1 procedente de los cruces entre machos LAB-PS con hembras SEL-B (○) y machos SEL-B con hembras LAB-PS (x).

**TABLA 20. Análisis Probit de la mortalidad de las generaciones F1, procedentes del cruce entre LAB-PS y SEL-B, frente las toxinas activadas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa.** Los cruces entre SEL-B y LAB-PS fueron realizados en masa y de forma recíproca. Los valores de CL<sub>50</sub> y los límites de confianza al 95% (LC<sub>95</sub>) se expresan en µg/ml. n: número de individuos

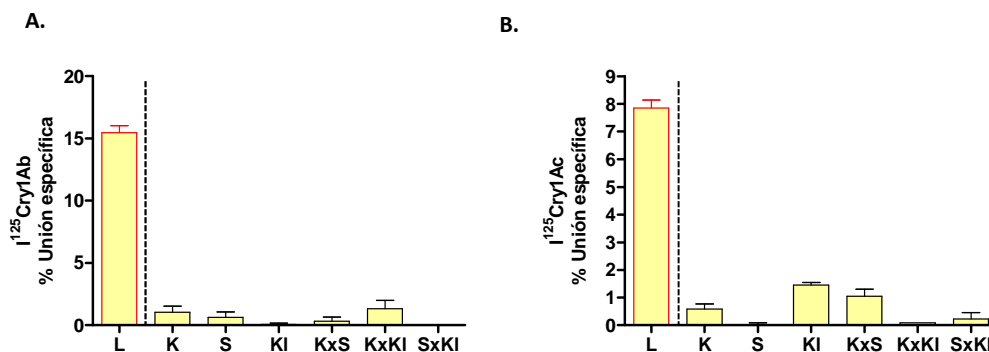
Toxina	Cruce	n	CL <sub>50</sub> (LC <sub>95</sub> )	Pendiente ± SE
<b>Cry1Ab</b>	♂LAB-PS x ♀SEL-B	207	10.25 (1.67-21.43)	1.04 ± 0.27
	♂SEL-B x ♀LAB-PS	250	41.28 (13.51-97.35)	0.84 ± 0.16
<b>Cry1Ac</b>	♂LAB-PS x ♀SEL-B	215	3.88 (0.12-7.73)	1.76 ± 0.62
	♂SEL-B x ♀LAB-PS	206	2.63 (0.68-5.34)	1.18 ± 0.17
<b>Cry1Fa</b>	♂LAB-PS x ♀SEL-B	99	13.06 (8.66-27.85)	2.01 ± 0.43
	♂SEL-B x ♀LAB-PS	178	58.54 (26.3-74.1)	2.54 ± 0.58

## 2.2 Ensayos de complementación genética entre las cepas resistentes Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang

Los análisis genéticos de complementación de los loci de resistencia entre las diferentes poblaciones resistentes Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang, llevados a cabo por el Dr. Sayyed (datos no publicados) mostraron que entre ellas compartían, al menos, un gen de resistencia (apartado 5.7 de Material y Métodos) lo que se traducía en una ausencia de complementación de los genes implicados en la resistencia de estas cepas.

A partir de los datos de mortalidad y de unión (ver más adelante en Resultados 3.2, 3.3 y 3.4) de estas cepas frente a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, y asumiendo que la ausencia de unión es recesiva, se determinó la ausencia/presencia de complementación analizando la unión de estas toxinas a BBMV preparadas a partir de las generaciones F1 obtenidas de los cruces en

masa entre las tres cepas: Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 46** donde queda representada la unión específica de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac frente a una concentración de BBMV de 0.3 mg/ml. Como cepa de referencia susceptible para estos ensayos se tomaron individuos de la colonia susceptible LAB-UK.



**FIGURA 46. Porcentaje de unión específica de Cry1Ab (A) y Cry1Ac (B) a BBMV de la cepa susceptible LAB-UK (L), de las resistentes Karak (K), Cry1Ab-SEL (S) y Kluang (KI), y de las generaciones F1 obtenidas del cruce entre ellas. La línea de puntos separa las cepas resistentes de la susceptible LAB-UK.**

El análisis estadístico (ANOVA de una vía-post-test Newman-Keuls) de los valores de unión específica obtenidos de Cry1Ab y Cry1Ac, mostró la ausencia de diferencias significativas entre las diferentes generaciones F1 y cada una de sus respectivas generaciones parentales, manteniéndose los bajos niveles de unión. En cuanto a los valores de unión específica de Cry1Ab y Cry1Ac mostrados por la colonia susceptible LAB-UK fueron significativamente mayores ( $p$ -valor $<0.05$ ) a los obtenidos de las cepas resistentes, como también lo fueron frente a los obtenidos de cada uno de los cruces para ambas toxinas: «Cry1Ab-SEL x Karak», «Karak x Kluang» y «Cry1Ab-SEL x Kluang».

La falta de complementación genética obtenida con los bioensayos del Dr. Sayyed quedaba asociada a los ensayos de unión a BBMV, pues en ambos casos, el fenotipo de la resistencia y la ausencia de unión de estas toxinas a

membrana, se mantenía en ambas generaciones. Así, podríamos estar ante una situación en la que ambos resultados pudieran estar apuntando hacia una misma dirección, en la que el mismo gen que genera ausencia de unión es el que subyace a la resistencia.

### **3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA EN LAS CEPAS SEL-B, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang**

#### **3.1 Ensayos de unión de la cepa SEL-B con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac**

Las bases bioquímicas de la resistencia en la cepa SEL-B se caracterizaron mediante ensayos de unión utilizando como control la colonia susceptible LAB-PS. Las BBMVs fueron preparadas a partir de individuos de las generaciones F66 y F70, por ser de las que mayor tasa de resistencia mostraban (**Fig. 43**). Los niveles de unión específica de la toxina marcada Cry1Ab fueron de  $0.2 \pm 0.1\%$  y  $2.1 \pm 0.1\%$  en SEL-B y LAB-PS a una concentración de BBMVs de 0.3 mg/ml, respectivamente (**Fig. 47A-Tabla 21**). Para Cry1Ac los niveles mostrados fueron de  $2.1 \pm 0.5\%$  y  $6.7 \pm 1.8\%$  a la misma concentración de BBMVs de SEL-B y LAB-PS (**Fig. 47B-Tabla 21**). Los valores de unión a concentraciones mayores de BBMVs no son comentados al ser 0.3 mg/ml el punto que se toma como referencia para la comparativa final con el resto de cepas de estudio de *P. xylostella* (**Tabla 21**).

La cepa resistente SEL-B, acorde a su fenotipo susceptible frente a Cry1Ac (ver apartado 1.2 de Resultados), presentó unión específica, aunque resultó ser menor que la mostrada por la colonia LAB-PS (**Fig. 47B**). La integridad de las BBMVs de SEL-B se comprobó a través de los marcadores enzimáticos: FAL, GGT y LAP (**Fig. 51**), tal y como se verá en el apartado 3.5.1.

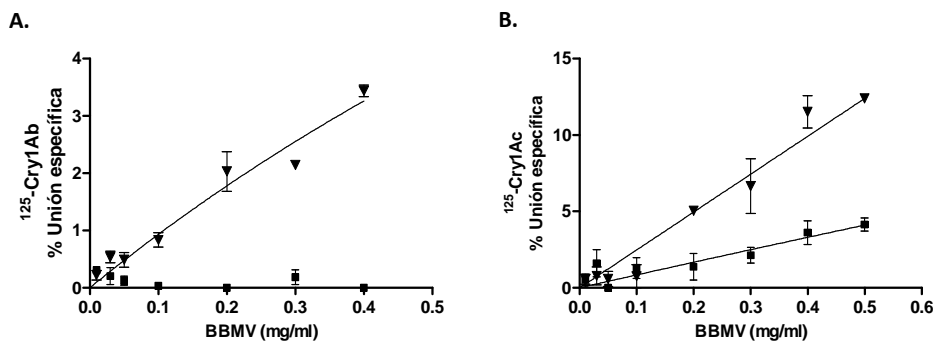
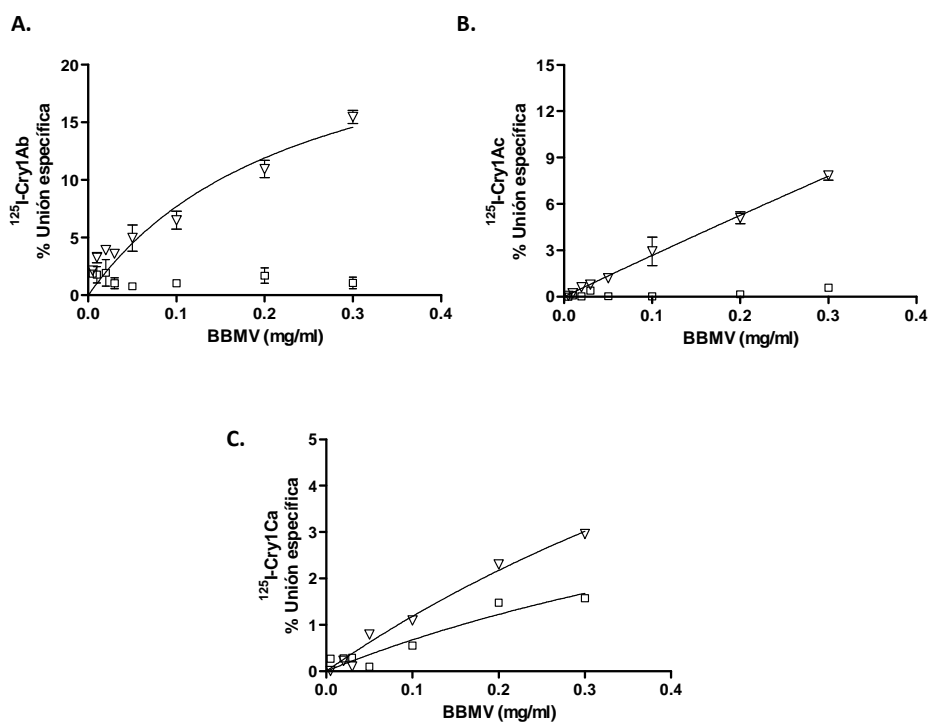


FIGURA 47. Porcentaje de unión específica de las toxinas activadas Cry1Ab-I<sup>125</sup> (A) y Cry1Ac-I<sup>125</sup> (B) a BBMVs de individuos de la colonia susceptible LAB-PS (▼) y de la cepa resistente SEL-B (■) de *P. xylostella*. Cada punto representa la media de dos ensayos de unión. Las barras en cada punto representan el SEM.

### 3.2 Ensayos de unión de la población Karak con las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ca

Los resultados obtenidos tras los experimentos de unión con las toxinas puras y activadas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ca mostraron una ausencia de unión para Cry1Ab-I<sup>125</sup> y Cry1Ac-I<sup>125</sup> en la población resistente Karak, contrastado con una presencia de unión específica en la cepa susceptible LAB-UK para las mismas toxinas (Fig. 48). Los valores de unión específica de Cry1Ab a 0.3 mg/ml de BBMVs, fueron de  $1.0 \pm 0.5\%$  y  $15.0 \pm 0.6\%$  para Karak y LAB-UK, de forma respectiva. Para la toxina Cry1Ac los valores fueron de  $0.6 \pm 0.2\%$  en la cepa Karak y  $8.0 \pm 0.3\%$  en LAB-UK (Fig. 48A,B-Tabla 21).

Los experimentos control de integridad de las BBMVs mediante la toxina Cry1Ca, a la que ambas cepas eran susceptibles, mostraron presencia de unión específica UK (Fig. 48C-Tabla 21).

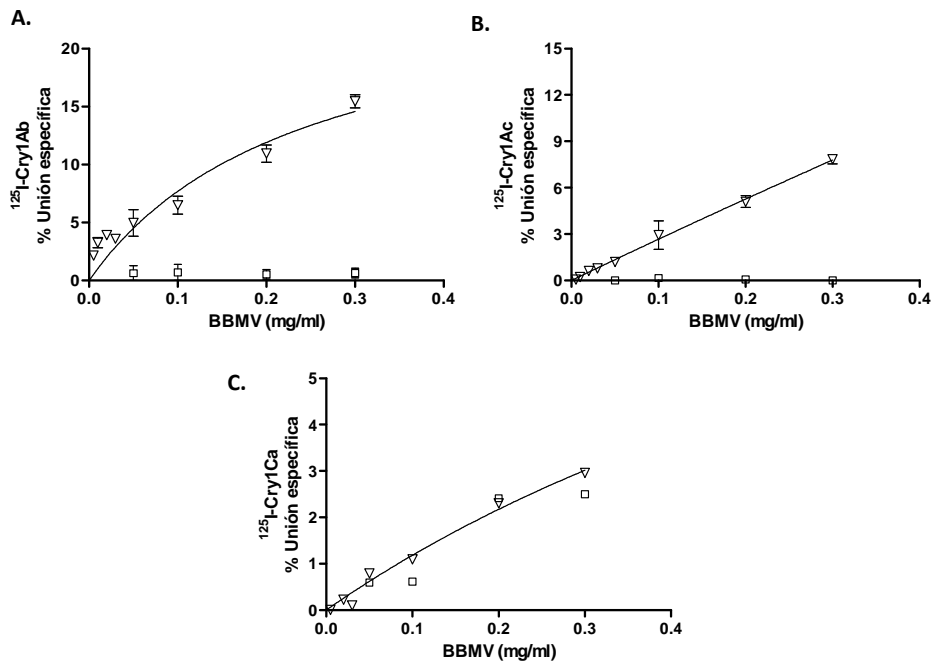


**FIGURA 48.** Representación gráfica de la unión específica de las toxinas puras y activadas Cry1Ab- $^{125}$ I (A), Cry1Ac- $^{125}$ I (B) y Cry1Ca- $^{125}$ I (C), frente a concentraciones crecientes de BBMVs preparadas a partir de la cepa susceptible LAB-UK ( $\nabla$ ) y la población resistente Karak ( $\square$ ). Cada punto representa un único experimento en el caso de Cry1Ca y de dos réplicas en el caso de Cry1Ab y Cry1Ac. Las barras de error representan el error estándar de la media.

### 3.3 Ensayos de unión de la cepa Cry1Ab-SEL con las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ca

La cepa resistente Cry1Ab-SEL también mostró una diferencia significativa de unión específica con la cepa susceptible LAB-UK. A una concentración de 0.3 mg/ml de BBMVs de Cry1Ab-SEL el porcentaje de unión específica fue de  $0.6 \pm 0.4\%$  para Cry1Ab y de ausencia de unión para Cry1Ac. Para LAB-UK los valores de unión específica fueron de  $15.0 \pm 0.6\%$  y  $8.0 \pm 0.3\%$  para Cry1Ab y Cry1Ac, respectivamente (Figura 49A,B-Tabla 21).

Los experimentos control de integridad de las BBMV mediante la toxina Cry1Ca, a la que ambas cepas eran susceptibles, mostraron presencia de unión específica (Figura 49C-Tabla 21).



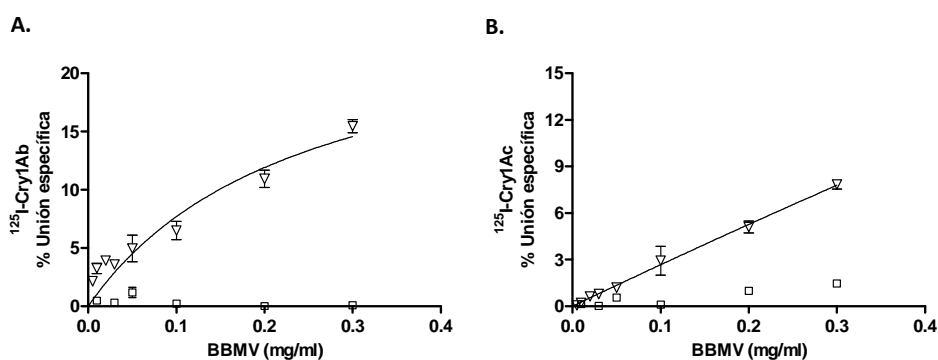
**FIGURA 49.** Representación gráfica de la unión específica de las toxinas puras y activadas Cry1Ab- $^{125}\text{I}$  (A), Cry1Ac- $^{125}\text{I}$  (B) y Cry1Ca- $^{125}\text{I}$  (C), en función de concentraciones crecientes de BBMV preparadas a partir de la cepa susceptible LAB-UK ( $\nabla$ ) y la población resistente Cry1Ab-SEL ( $\square$ ). Cada punto representa un único experimento en el caso de Cry1Ca y de dos réplicas en el caso de Cry1Ab y Cry1Ac. Las barras de error representan el error estándar de la media.



### 3.4 Ensayos de unión de la cepa Kluang con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac

Los porcentajes de unión específica en esta cepa, a 0.3 mg/ml de BBMV, para las toxinas puras, activadas y marcadas  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac fueron de  $0.1 \pm 0.01\%$  y de  $1.5 \pm 0.1\%$ , respectivamente. Para LAB-UK los valores de unión fueron de  $15.0 \pm 0.6\%$  y  $8.0 \pm 0.3\%$  para Cry1Ab y Cry1Ac, respectivamente, a esta misma concentración de BBMV (Fig. 50-Tabla 21).

Como control de integridad de las BBMV preparadas a partir de esta cepa se determinaron las actividades de los marcadores enzimáticos FAL, GGT y LAP (Fig. 51) obteniendo valores comparables a los mostrados por las cepas susceptibles LAB-PS o LAB-UK (apartado 3.5.1).



**FIGURA 50.** Representación gráfica de la unión específica de las toxinas puras y activadas Cry1Ab- $^{125}\text{I}$  (A) y Cry1Ac- $^{125}\text{I}$  (B), en función de concentraciones crecientes de BBMV preparadas a partir de la cepa susceptible LAB-UK (∇) y la población resistente Kluang (□). Cada punto la media de dos réplicas. Las barras de error representan el error estándar de la media.

**TABLA 21. Porcentaje de unión específica de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ca a una concentración de 0.3 mg/ml de BBMV de las diferentes cepas resistentes de estudio de *P. xylostella*.** Cada valor representa el porcentaje de unión respecto a la cepa susceptible correspondiente, esto es, de SEL-B frente a LAB-PS y de Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang frente a LAB-UK. En rojo se resaltan los valores considerados como ausencia de unión de la toxina Cry a BBMV.

Cepa	% Unión toxina Cry		
	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1Ca
SEL-B	9.5	31	nd
Karak	6.7	7.5	50
Cry1Ab-SEL	4	0	62.5
Kluang	0.7	18.8	nd

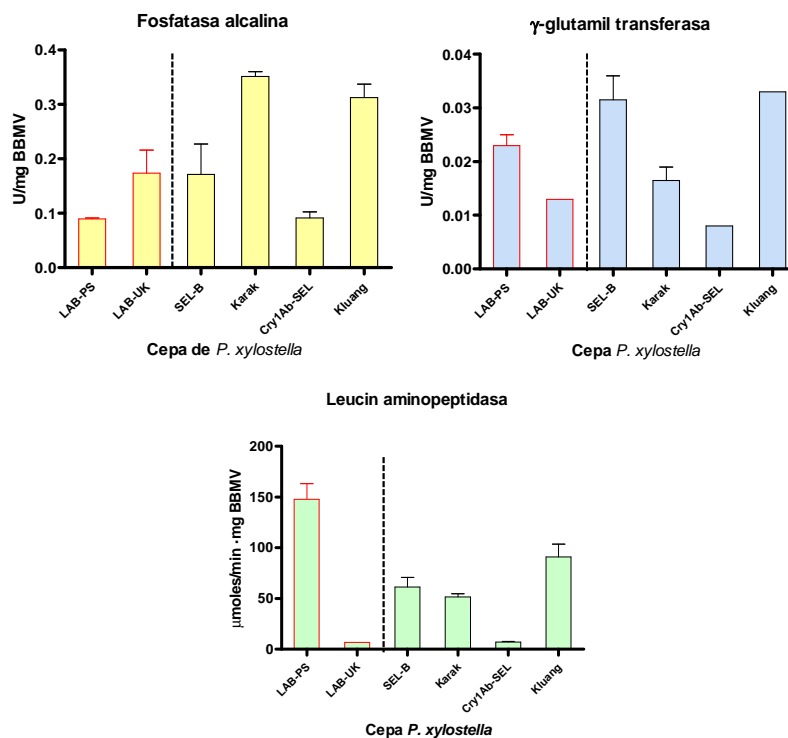
nd: no determinado

### 3.5 Perfiles enzimáticos

#### 3.5.1 Comparación del perfil enzimático entre cepas resistentes y susceptibles de *P. xylostella*

Los perfiles enzimáticos fueron determinados a partir de la actividad de las enzimas fosfatasa alcalina (FAL),  $\gamma$ -glutamyl transferasa (GGT) y leucin aminopeptidasa (LAP) en las cepas de estudio SEL-B, LAB-PS, Karak, Cry1Ab-SEL, Kluang y LAB-UK (Fig. 51). Las susceptibles LAB-PS y LAB-UK se emplearon como cepas de referencia.

Las concentraciones finales de BBMV procedentes de las cepas SEL-B, LAB-PS, LAB-UK, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang para el cálculo de la actividad de FAL y de la GGT fueron de 0.5 mg/ml. Para el cálculo de la actividad LAP se emplearon  $1 \cdot 10^{-3}$  mg de BBMV de SEL-B y LAB-PS,  $1 \cdot 10^{-4}$  mg de Karak, Cry1Ab-SEL y LAB-UK, y  $5 \cdot 10^{-5}$  mg de Kluang.



**FIGURA 51.** Actividades enzimáticas de las enzimas FAL, GGT y LAP en todas las cepas de *P. xylostella* susceptibles: LAB-PS, LAB-UK, y resistentes: SEL-B, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=2). La línea de puntos separa las cepas resistentes de las susceptibles.

El análisis estadístico ANOVA de una vía (post-test de comparación múltiple Newman-Keuls) de las cepas resistentes frente las susceptibles, destacó que para el enzima FAL existía una actividad significativamente mayor (p-valor < 0.05) en las cepas SEL-B (2 veces), Karak (4 veces) y Kluang (3 veces) frente LAB-PS (Tabla 22). Respecto a LAB-UK las cepas Karak y Kluang también presentaron valores superiores, lo que no ocurrió con SEL-B y Cry1Ab-SEL (Tabla 22). Entre las dos cepas susceptibles las diferencias de LAB-UK frente LAB-PS fue de dos veces (Tabla 22).

Las diferencias encontradas entre los valores de la actividad enzimática GGT fueron significativas entre SEL-B (3 veces) y Kluang (3 veces) frente LAB-UK, y de Cry1Ab-SEL (3 veces inferior) frente LAB-PS (p-valor < 0.05) (Fig. 51-Tabla 22).

La actividad del enzima LAP fue distinta en función de la cepa susceptible con la que era comparaba pues entre ellas presentaban diferencias de hasta 20 veces (p-valor < 0.05) (Fig. 51-Tabla 22). Así pues, la actividad de este enzima fue mayor (p-valor < 0.05) en las cepas resistentes SEL-B (9 veces), Karak (8 veces) y Kluang (13 veces) frente a la de LAB-UK; en cambio, frente a LAB-PS la actividad de este enzima fue significativamente menor en la totalidad de las cepas resistentes estudiadas (p-valor < 0.05) (Tabla 22).

Al comparar los valores de estos tres perfiles enzimáticos entre las cepas resistentes SEL-B, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang se observó que, en el caso del enzima FAL, las cepas Karak y Kluang presentaron una significativa mayor actividad (3 veces) frente a las cepas SEL-B y Cry1Ab-SEL (p-valor < 0.05) (Tabla 22). En el caso del enzima GGT las cepas SEL-B y Kluang (hasta 4 veces) fueron las que mayor actividad (p-valor < 0.05) presentaron respecto al resto (Tabla 22). Para el enzima LAP la mayor actividad se daba en las cepas SEL-B, Karak y Kluang 10 veces superior a la de la cepa Cry1Ab-SEL (Tabla 22).

Entre las dos cepas susceptibles LAB-PS y LAB-UK las diferencias significativas se encontraron para los tres enzimas. Para el enzima FAL la cepa LAB-UK mostró valores más elevados que LAB-PS (2 veces), para GGT LAB-PS mostró valores dos veces superiores a los de LAB-UK y para el enzima LAP fue la cepa LAB-PS la que mostró valores más elevados (21 veces) (p-valor < 0.05) (Tabla 22).

Tomando en conjunto la actividad enzimática de todas las cepas se vio como la actividad de la LAP fue significativamente mayor que la obtenida por la FAL, y ésta a su vez, mayor que la obtenida con la GGT (p-valor < 0.05) (Fig. 51).

**TABLA 22. Matrices de comparación de las actividades enzimáticas FAL, GGT y LAP entre las diferentes cepas de estudio.** Se indica el número de veces que el valor obtenido es mayor (valor positivo), menor (valor negativo) o que no presenta diferencias significativas (valor=0), entre las cepas susceptibles y resistentes.

	Fosfatasa alcalina (FAL)					
	SEL-B	Karak	Cry1Ab-SEL	Kluang	LAB-PS	LAB-UK
SEL-B	0	-3	0	-3	2	0
Karak	3	0	3	0	4	2
Cry1Ab-SEL	0	-3	0	-3	0	0
Kluang	3	0	3	0	3	2
LAB-PS	-2	-4	0	-3	0	-2
LAB-UK	0	-2	0	-2	2	0

	γ-glutamil transferasa (GGT)					
	SEL-B	Karak	Cry1Ab-SEL	Kluang	LAB-PS	LAB-UK
SEL-B	0	2	4	0	0	3
Karak	-2	0	2	0	0	0
Cry1Ab-SEL	-4	-2	0	-4	-3	0
Kluang	0	0	4	0	0	3
LAB-PS	0	0	3	0	0	2
LAB-UK	-2	0	0	-2	-2	0

(Continúa en la página siguiente)

	Leucin aminopeptidasa (LAP)					
	SEL-B	Karak	Cry1Ab-SEL	Kluang	LAB-PS	LAB-UK
SEL-B	0	0	10	0	-2	9
Karak	0	0	10	0	-3	8
Cry1Ab-SEL	-10	-10	0	-10	-20	0
Kluang	0	0	10	0	-2	13
LAB-PS	2	3	20	2	0	21
LAB-UK	-9	-8	0	-13	-21	0

En general, todos estos resultados parecían indicar la ausencia de cualquier tipo de asociación entre las actividades de estos tres marcadores enzimáticos con la resistencia mostrada por estas cepas. Sin embargo, no debe generalizarse pues puede que tal asociación dependa de la cepa de estudio en cuestión, como es el caso de las cepas Karak y Kluang las cuales muestran una clara diferencia frente las dos cepas susceptibles respecto a la actividad enzimática FAL (Fig. 51-Tabla 22).

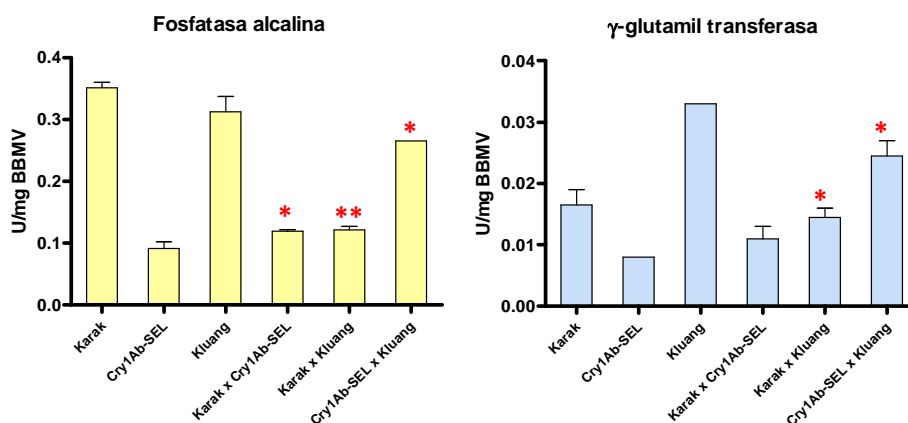
### 3.5.2 Caracterización del perfil enzimático de las enzimas fosfatasa alcalina (FAL) y $\gamma$ -glutamil transferasa (GGT) tras los ensayos de complementación.

Debido a la elevada variabilidad de la actividad del enzima LAP entre las cepas susceptibles y resistentes (Tabla 22), se midieron únicamente las actividades enzimáticas FAL y GGT con el fin de conocer la presencia, o ausencia, de complementación de los perfiles enzimáticos entre las cepas Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang y de las generaciones F1 producto del cruce entre ellas, asumiendo la recesividad de una baja actividad.

Estas actividades enzimáticas fueron medidas a 0.5 mg/ml de BBMV para cada una de las cepas. Con el resultado de estos ensayos también se conocería el estado de las BBMV preparadas de individuos liofilizados de las generaciones F1.

La actividad enzimática FAL fue obtenida de al menos dos medidas independientes (**Fig. 52**) y los análisis estadísticos se realizaron mediante un test ANOVA de una vía y el test de comparación múltiple Newman-Keuls. Así pues, los resultados mostraron diferencias significativas entre las distintas generaciones F1 respecto a las generaciones parentales. En los casos de las F1 de los cruces «Cry1Ab-SEL x Karak» y «Cry1Ab-SEL x Kluang» las diferencias se dieron únicamente frente a una de las cepas parentales, Karak y Cry1Ab-SEL, respectivamente. En el caso de la F1 «Karak x Kluang» las diferencias se dieron frente a ambos parentales (**Fig. 52**). El carácter dominante o recesivo que presentaba este marcador enzimático dependía de la cepa resistente; por ejemplo, la cepa Kluang tenía un carácter dominante pues la elevada actividad que presentaba era transmitida a la generación filial «Cry1Ab-SEL x Kluang» (**Fig. 52**); sin embargo, en Karak se comportaba de forma recesiva, al observarse que los individuos del cruce «Cry1Ab-SEL x Karak» no heredaban sus elevados niveles de actividad de este enzima (**Fig. 52**). Entre otras razones, esta situación puede indicar que más de un gen podría estar implicado en la actividad de este enzima. De hecho, en el momento en el que las cepas Karak y Kluang fueron cruzadas entre sí, la generación F1 resultante presentaba una significativa disminución de la actividad de FAL, a pesar de que ambas cepas por separado mostraban índices mayores. Con estos resultados se desestimó la utilidad del enzima FAL para determinar la asociación entre su actividad y la resistencia en estas cepas. Tampoco se observó relación alguna con los resultados de los ensayos de complementación genética obtenidos en los apartados anteriores (Bloque II; apartado 2.2) dada la variabilidad de la actividad mostrada por este marcador enzimático entre las tres cepas de estudio.

En cuanto a la actividad enzimática de la GGT (**Fig. 52**), los resultados mostraron la presencia de diferencias significativas en los casos de las F1 obtenidas de los cruces «Karak x Kluang» frente al parental Kluang y «Cry1Ab-SEL x Kluang» frente al parental Cry1Ab-SEL. Como en el caso anterior el perfil de este enzima en la cepa Kluang se comporta de carácter dominante o recesivo en función de la cepa con la que es cruzada. Así, en el cruce «Karak x Kluang» se comporta de forma recesiva y en el cruce «Cry1Ab-SEL x Kluang» de forma dominante (**Fig. 52**). Solo en el caso del cruce «Cry1Ab-SEL x Karak» podría existir complementación genética para el enzima GGT. Con todos estos resultados podría darse la situación de que, como en el enzima FAL, pudieran estar implicados varios genes en la expresión de este enzima. Por todo ello, este enzima tampoco se consideró de utilidad para determinar la asociación entre su actividad y la resistencia en estas cepas.



**FIGURA 52. Valores de las actividades obtenidas para los marcadores enzimáticos FAL y GGT en los cruces de los ensayos complementación genética.** Cada barra representa la media de, al menos, dos medidas independientes y el error estándar de la media. (\*) Presencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos en la generación F1 frente a los obtenidos en únicamente uno de los parentales. (\*\*) Presencia de diferencias significativas entre los valores de la generación F1 con los obtenidos en ambos parentales. Análisis estadístico ANOVA de una vía; post-test de comparación múltiple Newman-Keuls.



### BLOQUE III. ESTUDIO DEL MECANISMO DE TOLERANCIA A TOXINAS Bt EN DIFERENTES CEPAS DEL LEPIDÓPTERO INSECTO MODELO *Bombyx mori*

#### 1. BIOQUIMICA DE LA UNIÓN DE LAS TOXINAS Cry EN *B. mori*

##### 1.1 Perfil de unión a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en tres cepas de *B. mori*

##### 1.2.1 Cinética de unión con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac

El objetivo de este ensayo consistía en conocer el tiempo de incubación adecuado para los ensayos de saturación y de competencias con las diferentes cepas de *B. mori*. Para ello se tomaron BBMVs preparadas a partir de la cepa J65 a una concentración final de 0.05 mg/ml por reacción. La unión específica que se obtuvo, tanto de la toxina Cry1Ab como de la Cry1Ac, procedía de una sola réplica. El rango de tiempo empleado estaba comprendido entre 10 y 110 minutos (Fig. 53).

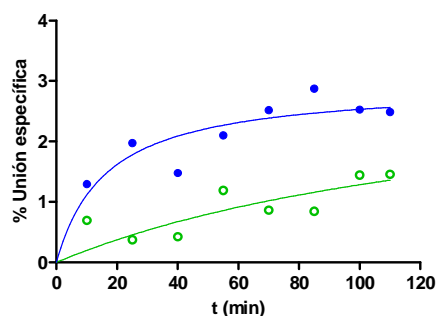


FIGURA 53. Cinética de unión específica de las toxinas puras y activadas Cry1Ab-I<sup>125</sup> (●) y Cry1Ac-I<sup>125</sup> (○) en BBMVs de la cepa J65 de *B. mori*. Se toman 100 min como período de incubación de estas BBMVs con las toxinas Cry. Se considera que es a partir de este punto cuando la unión empieza a ser estable. Cada punto representa un único valor.

La unión específica observada fue baja (**Fig. 53**) debido a la concentración de BBMV ensayada, la cual fue más de 10 veces inferior a la que se empleó en los ensayos de unión.

Los resultados mostraron que la unión de ambas toxinas a las BBMV de la cepa J65 empezó a ser estable a partir de los 100 minutos de incubación. Es por ello que se tomó este valor como tiempo de incubación en todos los ensayos de unión con BBMV de *B. mori* (**Fig. 53**).

### **1.2.2 Ensayos de unión con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac**

A través de estos ensayos se quería conocer si la unión de la toxina Cry1Ab al epitelio intestinal se encontraba afectada en la cepa tolerante C7 frente las cepas susceptibles J65 y Kin. La susceptibilidad a Cry1Ab y Cry1Ac suele darse de forma paralela en la mayor parte de los insectos estudiados, es por ello que se consideró que esta situación podía darse también en estas cepas. Así, a pesar de no tener los resultados de toxicidad con Cry1Ac, se llevaron a cabo los mismos ensayos de unión que con Cry1Ab, con el fin de determinar si el perfil de unión era comparable en ambas toxinas.

Los resultados mostraron la presencia de unión de la toxina Cry1Ab tanto en las cepas susceptibles J65 y Kin como en la tolerante C7 (**Fig. 54A**). Sin embargo, los niveles de unión fueron mayores, y equivalentes, entre las cepas C7 y J65, frente a Kin pues fue la cepa que menos unión presentó. Estos resultados mostraban que, a pesar de que la cepa C7 era tolerante a Cry1Ab, presentaba igualmente unión a esta toxina por lo que no parecía que este fuera el mecanismo de tolerancia seguido por esta cepa. En cuanto a la toxina Cry1Ac las tres cepas mostraron el doble porcentaje de unión que a Cry1Ab a la misma concentración de BBMV (0.3 mg/ml) (**Fig. 54B**).

Las concentraciones de BBMV elegidas para llevar a cabo los experimentos de competencias fueron de 0.20 mg/ml para los ensayos con Cry1Ab- $^{125}$ I y de 0.18 mg/ml para Cry1Ac- $^{125}$ I puesto que a tales concentraciones se obtuvo, aproximadamente, el 50% de la unión específica total de cada toxina.

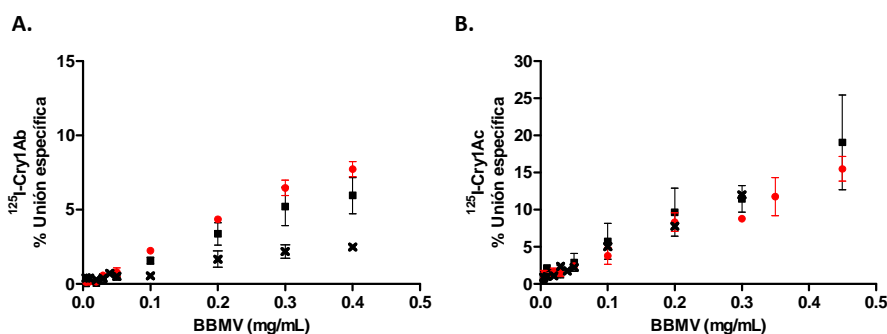


FIGURA 54. Unión específica de las toxinas puras y activadas Cry1Ab- $^{125}$ I (A) y Cry1Ac- $^{125}$ I (B) en función de concentraciones crecientes de BBMV de la cepas J65 (■), Kin (x) y C7 (●). Cada punto representa la media de dos réplicas. Las barras de error representan el error estándar de la media.

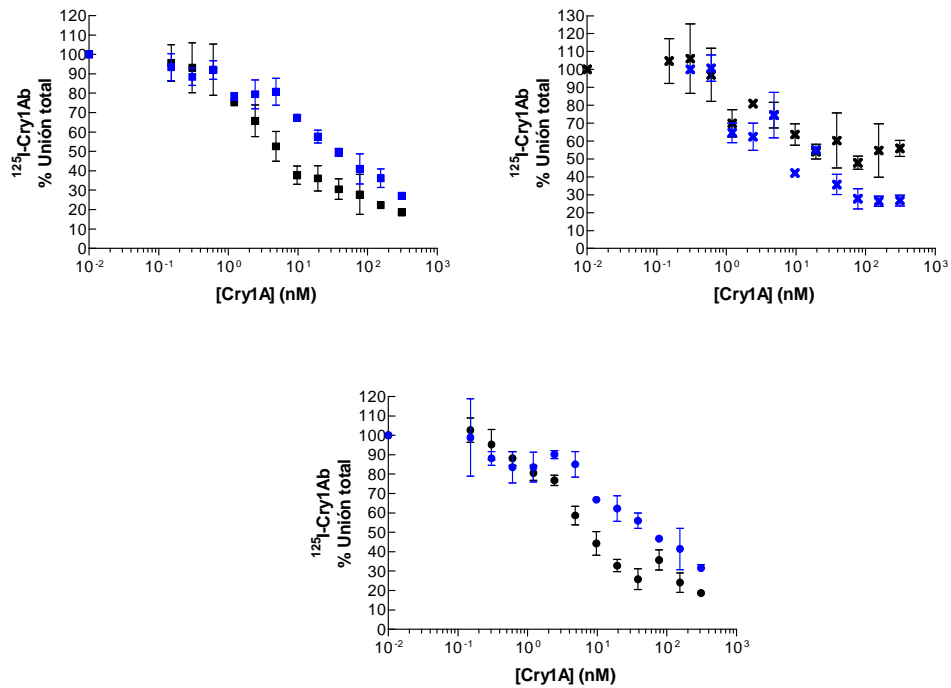
### 1.2.3 Ensayos de competencias con Cry1Ab y Cry1Ac

Dada la presencia de unión específica de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac a BBMV de las tres cepas C7, J65 y Kin, se procedió a realizar pruebas de competencia homólogas y heterólogas (Fig. 55 y 56), con el objetivo de averiguar el modelo de receptores de estas toxinas y si eran compartidos entre ellas.

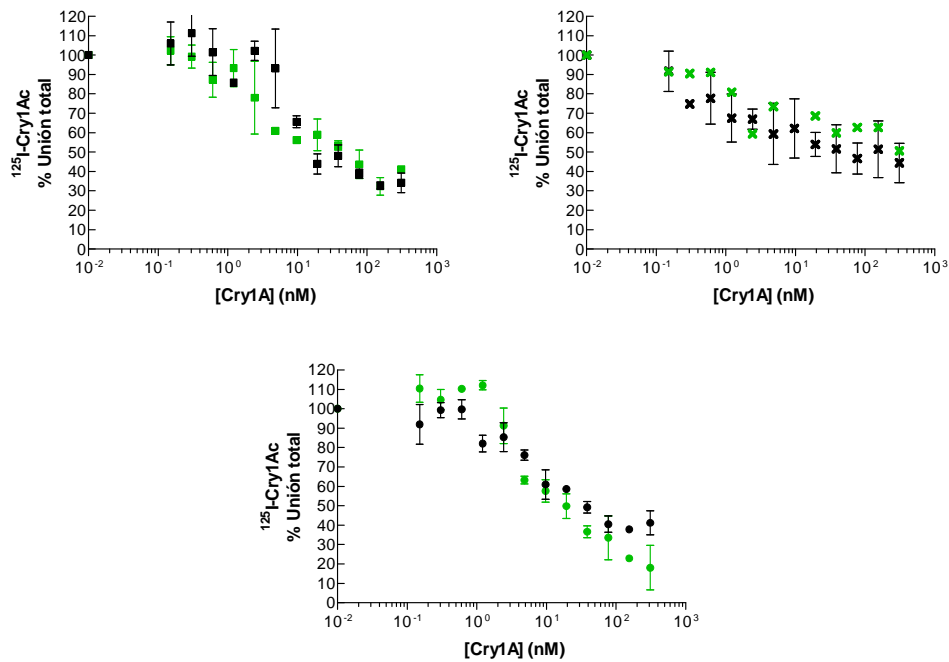
Los análisis cuantitativos a partir de los datos de competición homóloga para Cry1Ab- $^{125}$ I y Cry1Ac- $^{125}$ I, mostraron estar acorde con un modelo de un único sitio de unión. Los parámetros de equilibrio de la unión: la constante de disociación ( $K_d$ ) y la concentración de sitios de unión ( $R_t$ ) obtenidas de la uniones con Cry1Ab y Cry1Ac (Tabla 23), en cada una de las cepas, no

mostraron diferencias significativas entre ellas (t-test  $p > 0.05$ ). Estos parámetros tampoco difirieron significativamente entre las tres cepas (t-test  $p > 0.05$ ) ni para Cry1Ab ni para Cry1Ac. Sin embargo, en el caso concreto de la cepa J65, el nivel de significación de las diferencias entre los valores  $K_d$  de Cry1Ab de esta cepa frente al resto, no fue muy elevado. Esta situación podría estar indicando que la cepa susceptible J65 se caracterizaría por presentar una menor afinidad por Cry1Ab (valor más alto de  $K_d$ ), sin embargo, parece que este valor se ve compensado con un valor de  $R_t$  más elevado. De hecho, al observar los ratios de afinidad  $R_t/K_d$  se deduce que el resultado de este cociente en J65 es comparable al de la cepa Kin (Tabla 23).

En cuanto a las competencias heterólogas, incubando la toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup> con el competidor Cry1Ac, se pudo observar que, en las cepas J65 y C7, la toxina Cry1Ac no consiguió desplazar totalmente a la toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup> (Fig. 55). Cuando el ensayo de competencias se realizó empleando como toxina marcada Cry1Ac-I<sup>125</sup> y como competidor la toxina Cry1Ab, se vió como ésta desplazaba totalmente a la primera (Fig. 56). Todo ello sugería la presencia de dos receptores para la toxina Cry1Ab, uno compartido con la toxina Cry1Ac y el otro sin compartir. En la cepa Kin esta situación no se observó, lo que podría deberse a que en este caso la unión inespecífica era mayor (55% vs. 25% de la unión total).



**FIGURA 55. Ensayos de competencias mediante la toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup>.** Se representa el comportamiento de la unión de Cry1Ab-I<sup>125</sup> a BBMV de las cepas J65 (■), Kin (x) y C7 (●) frente a concentraciones crecientes del competidor homólogo Cry1Ab (negro) o heterólogo Cry1Ac (azul). En cada punto se representa la media de dos réplicas de unión específica y el error estándar de la media.



**FIGURA 56. Ensayos de competencias mediante la toxina Cry1Ac-<sup>125</sup>I.** Se representa el comportamiento de la unión de Cry1Ac-<sup>125</sup>I a BBMV de las cepas J65 (■), Kin (x) y C7 (●) frente a concentraciones crecientes del competidor homólogo Cry1Ac (negro) o heterólogo Cry1Ab (verde). En cada punto se representa la media de dos réplicas de unión específica y el error estándar de la media.

**TABLA 23. Parámetros de equilibrio de la unión de Cry1Ab-<sup>125</sup>I y Cry1Ac-<sup>125</sup>I a BBMV de *B. mori*.** Resultado de los ensayos de competencias homólogas a Cry1Ab-<sup>125</sup>I y Cry1Ac-<sup>125</sup>I a BBMV de las cepas J65, Kin y C7 de *B. mori*. Cada valor procede de la media ( $\pm$  SEM) de al menos dos réplicas diferentes.

Cepa	Cry1Ab- <sup>125</sup> I			Cry1Ac- <sup>125</sup> I		
	$K_d$	$R_t$	$R_t/K_d$	$K_d$	$R_t$	$R_t/K_d$
J65	5.70 $\pm$ 0.62	0.92 $\pm$ 0.35	0.16	6.67 $\pm$ 4.19	2.08 $\pm$ 1.19	0.31
Kin	1.34 $\pm$ 0.93	0.12 $\pm$ 0.02	0.09	2.59 $\pm$ 0.98	0.42 $\pm$ 0.16	0.16
C7	1.81 $\pm$ 1.12	0.46 $\pm$ 0.29	0.25	8.46 $\pm$ 5.64	2.19 $\pm$ 1.34	0.26

### 1.2.4 Actividad enzimática leucin aminopeptidasa (LAP) en BBMV

El control de la integridad de las BBMV de las cepas C7, J65 y Kin, se realizó a través de la actividad mostrada por el enzima LAP (Fig. 57). El análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante una ANOVA de una vía mostró la ausencia de diferencias significativas de la actividad LAP entre las tres cepas: J65, C7 y Kin. Esto revelaba la ausencia de asociación de la tolerancia a Cry1Ab con la actividad del enzima LAP para estas cepas. Al comparar estos perfiles enzimáticos con los obtenidos con las diferentes cepas de estudio de *P. xylostella* (Fig. 51), sorprendía la similitud de los valores entre las tres cepas de *B. mori*.

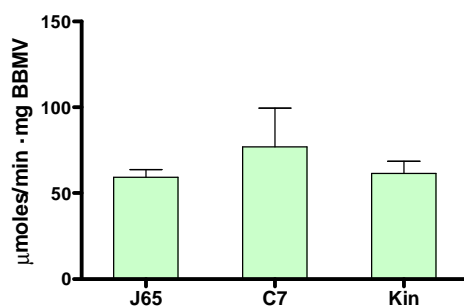


FIGURA 57. Actividad enzimática del enzima LAP en BBMV de las cepas de *B. mori*: J65, Kin y C7. Las barras de error representan el error estándar de la media procedente de 2 réplicas.

## 1.2 Caracterización de la unión reversible e irreversible de la toxina Cry1Ab a BBMV de *B. mori*

### 1.2.1 Cinética de unión de Cry1Ab en la cepa J65 de *B. mori*

La elección de la cepa J65 para el estudio de la cinética de unión estaba relacionada con el perfil de susceptibilidad que mostraba frente a las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, siendo más susceptible que la cepa Kin para esta última toxina (Tabla 6; Material y métodos apartado 1.2).

Así pues, se determinaron las componentes de reversibilidad-irreversibilidad de la unión de Cry1Ab a través de los experimentos de asociación y disociación (Fig. 58). Las BBMV incubadas con 0.17 nM de Cry1Ab-I<sup>125</sup> presentaron una unión específica estable de un 6% a los 100 minutos. La adición posterior de un exceso de toxina Cry1Ab no marcada hizo disminuir la cantidad de unión específica, estabilizándose en un 1.5% a los 125 minutos (Fig. 58). Este 1.5% representaba la fracción de unión irreversible que, a su vez, representaba acerca del 25% del total de la unión específica que se obtuvo en el ensayo de asociación. El 4.5% de la unión fue desplazada de forma reversible (representando acerca del 75% de la unión total). El cálculo de la unión no específica, así como los ensayos control fueron los mismos que los presentados en el punto anterior.



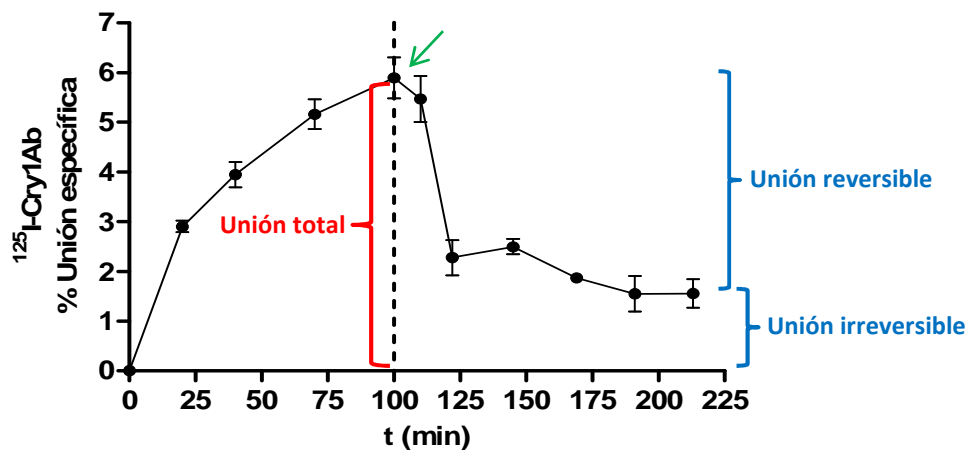


FIGURA 58. Representación de la cinética de asociación y disociación de la unión de  $^{125}\text{I-Cry1Ab}$  con BBMV de larvas de la cepa J65 de *B. mori*. La flecha indica la adición de un exceso de 1000 veces de toxina sin marcar. Este momento representa el final del experimento de asociación y el inicio del de disociación. La separación entre experimentos se señala con una línea vertical de puntos. Los valores representados corresponden al total de la unión específica. Cada punto representa la media de dos réplicas y las barras el SD.

### 1.2.2 Ensayos de disociación con las cepas J65, Kin y C7. Determinación de la unión reversible e irreversible

Los dos tipos de unión, reversible e irreversible, fueron determinados mediante ensayos de disociación. Estos ensayos, basados en el desplazamiento de la toxina marcada mediante un exceso de toxina no marcada a diferentes tiempos, fueron llevados a cabo con Cry1Ab en las cepas de estudio J65, Kin y C7 debido a que no existían diferencias relevantes en la afinidad de la unión para esta toxina.

En las tres cepas se observó que la toxina  $^{125}\text{I-Cry1Ab}$  era desplazada por la misma toxina no marcada, reflejando que en las tres cepas existía una parte de unión reversible (Fig. 59A). Sin embargo, en la cepa C7 este desplazamiento resultaba ser mucho más rápido que en las dos cepas restantes ( $t_{50} = 8$  min vs. 30-36 min). Además, aproximadamente a los 50 minutos, la unión de la toxina

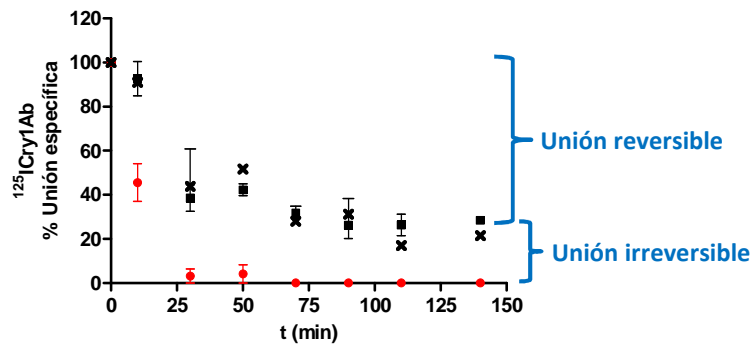
Cry1Ab-I<sup>125</sup> quedaba totalmente desplazada, revelando que el 100% de la unión específica era reversible (**Fig. 59A**).

El resultado obtenido con la cepa C7 contrastaba con los resultados obtenidos de las cepas J65 y Kin, en las que la unión de Cry1Ab-I<sup>125</sup> no conseguía ser desplazada por Cry1Ab ni empleando largos tiempos de incubación (**Fig. 59A**). Además, en estas dos cepas la curva de disociación llegó a una asíntota de aproximadamente un 25% de la unión específica total, lo que venía a traducirse en que el 25% de la unión específica total era de tipo irreversible.

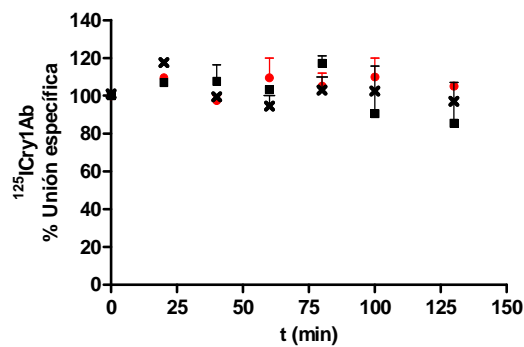
En los experimentos control (adición de tampón PBS1x en lugar del exceso de toxina Cry1Ab no marcada) la unión específica se mantenía a lo largo del tiempo (**Fig. 59B**).

La unión inespecífica (restada a todos los valores de unión obtenidos) fue determinada mediante ensayos de incubación de BBMV de la cepa J65, con las toxinas, a la vez, Cry1Ab-I<sup>125</sup> y Cry1Ab. Su valor fue de  $2.5 \pm 0.1\%$  (media  $\pm$  SD) y se mantuvo estable durante todo el transcurso del experimento.

A.



B.



**FIGURA 59.** Cinética de disociación de la unión específica de Cry1Ab- $^{125}\text{I}$  a BBMV de las tres cepas de *B. mori*: J65 (■), Kin (x) y C7 (●). (A) La cinética de disociación específica de de Cry1Ab- $^{125}\text{I}$  representada caracteriza a las cepas susceptibles J65 y Kin por presentar un porcentaje de unión irreversible y a la cepa tolerante C7 por mostrar prácticamente la totalidad de la unión de tipo reversible. (B) Se representan los controles de este ensayo para cada una de las cepas. El motivo por el que algunos de los puntos presentan valores superiores al 100% se debe a que son referenciados al primer valor (tiempo 0 donde el 100% de la unión no ha sido desplazada).

## 2. MODELO DE RECEPTORES EN *Bombyx mori*

### 2.1 Las APN y las caderinas como candidatos a receptores de Cry1Ab

Para averiguar si las aminopeptidasas o la caderinas estaban involucradas en el modo de acción de la toxina Cry1Ab en *B. mori* se llevaron a cabo los ensayos indicados en el apartado 6.9 de Material y Métodos.

Dos tipos de controles fueron llevados a cabo, uno mediante la incubación de las BBMV con tampón PBS1x (sin anticuerpos) y el segundo añadiendo el anticuerpo anti-GST (**Fig. 60**). La unión de la toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup> se mantenía estable durante los 100 minutos, asumiendo pues la integridad de las BBMV. El anticuerpo anti-GST no cambiaba el porcentaje de unión de la toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup> ( $p > 0.05$ , ANOVA de una vía, post-test de Bonferroni) indicando que este anticuerpo de revelado no interfería en el proceso de unión de la toxina Cry1Ab.

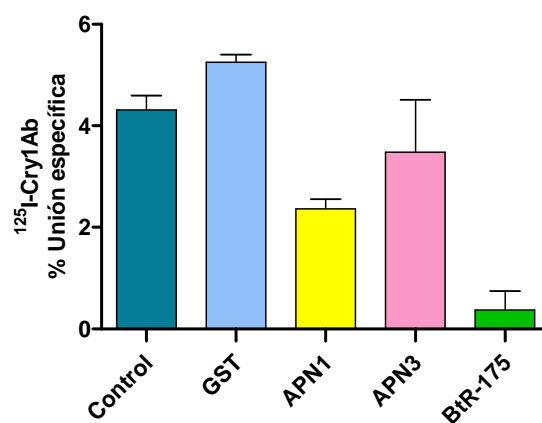
La determinación de que los anticuerpos no intervenían en el cálculo de la unión inespecífica de la toxina Cry1Ab-I<sup>125</sup> se llevó a cabo mediante la incubación de las BBMV con Cry1Ab junto con los anticuerpos anti-GST y anti-BmAPN3. Los valores obtenidos fueron muy similares a los de la unión inespecífica de las BBMV siendo de 2.6% (**Tabla 23**). Este valor fue restado a cada uno de los valores de unión para el resto de ensayos.

Los resultados de unión de Cry1Ab obtenidos de los controles no difirieron de forma significativa de los obtenidos con el antisuero anti-BmAPN3 ( $p > 0.05$ , ANOVA de una vía, post-test de Bonferroni) (**Fig. 60**). Sin embargo, sí hubieron diferencias significativas en la cinética de unión de la toxina Cry1Ab al emplear los anticuerpos anti-BtR175 y anti-BmAPN1 ( $p > 0.05$ , ANOVA de una vía, post-test de Bonferroni) pues se redujo de forma considerable la unión

específica total de Cry1Ab-<sup>125</sup>I en un 84% a la proteína tipo caderina BtR175 y en un 55% a la BmAPN1 (Fig. 60).

**TABLA 23. Porcentaje de unión inespecífica obtenida a través del ensayo de disociación bajo distintas condiciones.** Incubación de las BBMV de la cepa J65 sin anticuerpo a diferentes tiempos, con anticuerpo anti-BmAPN3 y con anticuerpo anti-GST durante 90 min.

Anticuerpo	Tiempo (min)	% unión inespecífica ± SEM
Sin anticuerpo	0	2.42 ± 0.03
	30	2.85 ± 0.06
	60	2.56 ± 0.00
	90	2.75 ± 0.10
Anti-BmAPN3	90	2.42
Anti-GST	90	2.38



**FIGURA 60. Experimentos de asociación de la unión de Cry1Ab-<sup>125</sup>I con BBMV de la cepa J65 de *B. mori*.** Las BBMV fueron preincubadas durante 1h con los diferentes anticuerpos (anti-GST, antisuero anti-APN3, anti-APN1 o anti-BtR175) o con tampón PBS 1x (control) antes de añadir la toxina marcada. Los valores representan la unión específica total tras 100 min de incubación. Se llevaron al menos dos réplicas por cada ensayo. Las barras de error representan el SEM.

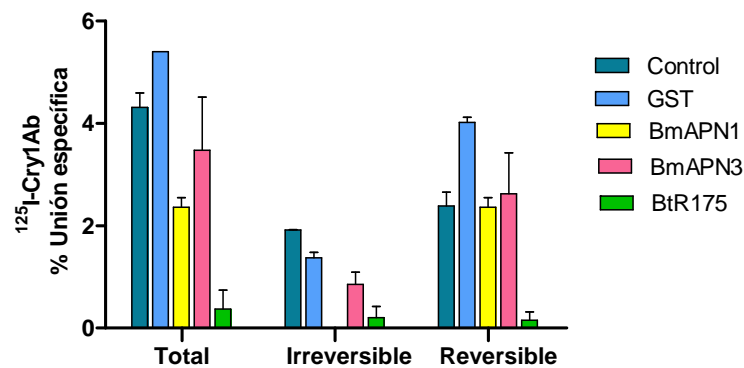
## 2.2 Modelo de unión de la toxina Cry1Ab en *B. mori*

Para conocer qué componentes de la unión (reversible/irreversible) de la toxina Cry1Ab a BmAPN1 y a BtR175 de la cepa J65 estaban afectados se llevaron a cabo experimentos de disociación, incubando las BBMV con los anticuerpos anti-BmAPN1 y anti-BtR175 pero añadiendo, tras el período de incubación, un exceso de toxina no marcada Cry1Ab. Como control se llevó a cabo el mismo procedimiento pero con la incubación de las BBMV con tampón PBS 1x, de esta forma se obtenía el valor de unión total, la parte reversible y la irreversible. Para determinar que el anticuerpo anti-GST no intervenía en ambos tipos de uniones fue incubado con las BBMV llevando a cabo el procedimiento anterior. Los resultados obtenidos de estos dos tipos de controles fueron similares (t-test,  $P < 0.05$ ) indicando que el anticuerpo anti-GST no intervenía en el proceso de unión de la toxina Cry1Ab-<sup>125</sup>I, además el valor fue similar al obtenido en los ensayos de asociación indicando que las BBMV se mantenían íntegras a pesar de la hora de incubación previa a los ensayos de asociación-disociación (Fig. 61).

Los resultados obtenidos con estos ensayos revelaron una marcada reducción de la unión reversible e irreversible de Cry1Ab con anti-BtR175 (Fig. 61), cuyos valores no fueron significativamente diferentes de los obtenidos de unión inespecífica (t-test,  $P > 0.05$ ). Por el contrario, empleando el anticuerpo anti-BmAPN1 únicamente quedó afectada la unión irreversible (con un valor similar a la unión inespecífica), mientras que la unión reversible no fue afectada presentando valores comparables a los obtenidos con el control (t-test,  $P > 0.05$ ) (Fig. 61). Mediante la incubación con el antisuero anti-BmAPN3 se obtuvo una reducción considerable de la unión irreversible, aunque no desapareció como en el caso del anticuerpo anti-BmAPN1, por lo que parece que no bloqueó del todo la unión de la toxina Cry1Ab (Fig. 61).

Estos resultados indicaban que BmAPN1 y BtR175 estaban involucradas en la unión de Cry1Ab a las BBMV en solución y que la unión irreversible a BmAPN1

era la que estaba principalmente afectada. De esta manera, si la unión total se compone de una parte reversible a la que le sigue la parte irreversible, al bloquear la primera se bloquea el proceso completo de unión, que es lo que se conseguía al emplear el anticuerpo anti-BtR175. En cambio, si se bloquea la parte irreversible aún se observaría unión, la correspondiente a la parte reversible, que es lo que parece que se obtenía al emplear el anticuerpo anti-BmAPN1.



**FIGURA 61. Experimentos de disociación de la unión de Cry1Ab- $^{125}$ I con BBMV de la cepa J65 de *B. mori*.** Las BBMV fueron preincubadas durante 1h con anticuerpos anti-BmAPN1, suero anti-BmAPN3, anti-BtR175, o tampón PBS1x como control, antes de añadir la toxina Cry1Ab no marcada. Se llevaron a cabo al menos dos réplicas por experimento. Las barras de error representan el SEM. Los resultados obtenidos del control no presentan barra de error debido a la similitud de las réplicas. No se detectó unión irreversible cuando las BBMV fueron incubadas con anticuerpo anti-BmAPN1.

## V. DISCUSIÓN

### BLOQUE I. CARACTERIZACIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA LOS RECEPTORES DE LAS TOXINAS Cry. ESTUDIO DE LIGAMIENTO

#### 1. Estructura genómica y caracterización de genes codificantes para aminopeptidasas

En este estudio se ha determinado parte de la estructura genómica de las aminopeptidasas descritas en *P. xylostella*: PxAPN1 (Denolf *et al.*, 1997), PxAPN2 (Denolf P., no publicada), PxAPN3 (Nakanishi *et al.*, 2002) y PxAPNA (Chang *et al.*, 1999). En concreto se determinó la posición de uno de los primeros intrones en cada una de estas secuencias tomando como referencia la estructura genómica parcial descrita en la APN1 de *M. sexta*. Los resultados mostraban que el primer de los intrones descritos en PxAPN1\*, PxAPN3\* y PxAPNA\* se situaba aproximadamente a unas 100 pb en dirección 3' respecto a la posición homóloga del primer intrón descrito en MsAPN1. En el caso del primer intrón de los dos descritos en PxAPN2\*, se comprobó que se situaba en dirección 5' a 182 pb respecto al primer intrón de MsAPN1.



Al comparar las posiciones de los intrones secuenciados entre sí pudimos comprobar que todos, salvo el primero en PxAPN2\*, compartían una posición homóloga. Ello podría indicar que, *a priori*, las cuatro aminopeptidasas podrían compartir la misma estructura genómica, al menos de forma parcial, pues debería de continuarse con el proceso de amplificación y secuenciación.

El tamaño de los intrones descritos fue similar entre las cuatro aminopeptidasas, aunque presentaban un parecido mayor entre las PxAPN1\* y PxAPN2\* y entre las PxAPN3\* y PxAPNA\*. Esta homología podría estar acorde con la clasificación filogenética de las aminopeptidasas según Herrero *et al.* (2005) y Crava *et al.* (2010), donde situaban las agrupaciones que incluían las PxAPN3 y PxAPNA a una distancia filogenética menor que la que había entre las agrupaciones de las PxAPN1 y PxAPN2.

La dificultad en la amplificación de la PxAPN3 en el presente trabajo coincide con los resultados del trabajo de cartografiado de las aminopeptidasas de *P. xylostella* de Baxter *et al.*, (2008). En éste no pudieron asignar la PxAPN3 a ningún grupo de ligamiento ni en cepas susceptibles ni en resistentes, debido a que no fue posible su amplificación por PCR. Los autores apuntaron a que podía deberse a la posibilidad de haber encontrado un intrón demasiado grande para poder ser amplificado. En nuestro trabajo tampoco conseguimos amplificar la PxAPN3 tras numerosos intentos y bajo diferentes condiciones de PCR, distintos diseños de cebadores, etc. Sin embargo, conseguimos amplificar esta aminopeptidasa tomando como secuencias modelo las APN3 de otras especies de insectos lepidópteros, la BmAPN3 y HaAPN3. La secuencia de aminopeptidasa 3 que conseguimos amplificar (PxAPN3\*) difería de la PxAPN3 publicada en una región de 143 pb, región en la que pudimos situar un intrón. Esta región de 143 pb proporcionó al amplificado una mayor similitud con otra APN3 de *P. xylostella*, publicada posteriormente, la PxAPN3R por lo que consideramos que podíamos estar ante la posibilidad de que ambos tipos de APN3: la PxAPN3 y la PxAPN3R, procedieran de la duplicación de genes. Estos genes podrían funcionar de forma distinta pues presentaron una

homología diferente con dominios característicos de la familia de las aminopeptidasas. Este mismo resultado fue obtenido en el trabajo de Baxter *et al.* (2008), donde la secuencia EST de aminopeptidasa 3 de *P. xylostella* (que clasifican dentro del grupo de aminopeptidasas de Clase 3) difería de la PxAPN3 (Nakanishi *et al.*, 2002) de hecho, esta EST presentó una elevada homología con nuestra secuencia genómica parcial PxAPN3\*. Esta duplicidad de genes de APN también fue observada en dos secuencias parciales de APN de *P. xylostella* de Clase 4, así como en dos aminopeptidasas 3 de *O. nubilalis* (Baxter *et al.*, 2008). Así, es posible que distintas poblaciones cuenten solo con uno de los genes o ambos.

## 2. Análisis filogenético

Tras el análisis filogenético de todas las secuencias aminopeptídicas definidas en el apartado 5.5 de Material y Métodos se obtuvo un filograma muy similar al publicado por Crava *et al.* (2010) y Hughes (2014). El árbol filogenético contenía 8 clases además de la clase que englobaba las ASP. Todas las clases, exceptuando las 6, 7 y 8, agrupaban una secuencia de aminopeptidasa de *P. xylostella* gracias a que nuevas secuencias publicadas fueron incluidas en el análisis filogenético. Únicamente la PxAPN-G no pudo ser agrupada en ninguna de las clases descritas, por lo que podría situarse en una posición evolutiva más distante a las 8 clases obtenidas, de hecho presentaba un elevado porcentaje de similaridad con la OnAPN5. El filograma publicado por Hughes (2014) situaba a estas dos secuencias en la clase 5 a pesar de que los resultados con BLASTp no mostraban una elevada similaridad con el resto de secuencias de esta clase.

Las secuencias genómicas parciales PxAPN1\*, PxAPN2\* y PxAPNA\* obtenidas en este trabajo se situaron en la misma posición que sus respectivas secuencias de origen. Sin embargo, la PxAPN3\* aunque se situaba en el misma clase que la PxAPN3 quedó en un subgrupo distinto, compartido con la PiAPN, por lo que podría estar dándose la situación de que se tratara de la

presencia de dos alelos del mismo gen o ante a una duplicidad de genes. Esta misma situación presentaba cierta correspondencia con las aminopeptidasas de tipo 3 de *O. nubilalis* (Crava *et al.*, 2010; Hughes, 2014) y de *Chilo suppressalis* (Hughes, 2014) pues aunque los autores las definen como genes distintos se situaban a una distancia evolutiva menor que la que separa las PxPAN3 y PxAPN3\* de *P. xylostella*, según el filograma obtenido en este trabajo. La aparición de genes duplicados dentro de esta clase podría estar relacionada con lo que expone Hughes (2014) sobre la especialización funcional de este tipo de aminopeptidasa según el patrón de expresión que presentan según el tipo de tejidos.

Dentro del análisis filogenético también fueron incluidas un mayor número de secuencias de *B. mori* que las empleadas en otros trabajos (Crava *et al.*, 2010; Hughes, 2014). La mayoría de ellas (BmAPN8, 9, 10, 12 y 14) fueron agrupadas en la clase de las ASP y dos de ellas, en concreto la BmAPN11 y la BmAPN13, establecieron una nueva clase, la Clase 7, que no aparecía en el trabajo de Hughes (2014).

La distribución de las diferentes clases en el árbol filogenético resultante mostró como la Clase 2 guardaba una estrecha relación con las aminopeptidasas ASP, lo que indicaba que esta clase presentaba una trayectoria evolutiva distinta al resto de clases. Este resultado coincidía con el trabajo de Hughes (Hughes, 2014) cuyos resultados apuntaban hacia la misma dirección planteando la hipótesis de que las aminopeptidasas de Clase 2 procedieron de una duplicación genética ancestral. El resto grupos hermanos coincidían, en general, con los establecidos en los filogramas de los otros trabajos (Crava *et al.*, 2010; Hughes, 2014), sin embargo habían ciertas salvedades, como es el caso de la Clase 7 la cual se situaba en el mismo grupo que las Clases 5 y 6, y las Clases 4 y 8 las cuales se situaban entre ellas a una distancia menor constituyendo un único grupo.

### 3. Motivo conservado

Una de las características que definían el motivo conservado descrito en las secuencias ortólogas MsAPN1, PxAPNA, HaAPN1 y BmAPN era que pertenecía a una región definida dentro del grupo de las metaloproteasas; otra característica de este motivo era su posición flanqueante a un intrón. Esta posición podría estar relacionada con el proceso de *splicing* en este grupo de aminopeptidasas ortólogas. Trabajos como los de Carvalho y Clark (1999) indicaron que los intrones de mayor tamaño se acumulaban en regiones con una reducida tasa de recombinación dentro del genoma de *Drosophila melanogaster*. De forma alternativa Prachumwat *et al.* (2004) encontraron que el tamaño de los intrones estaba relacionado de forma positiva con la tasa de recombinación en *Caenorhabditis elegans*. Así pues, las diferencias en tamaño vistas en los distintos intrones descritos en esta tesis podrían estar relacionadas con la tasa de recombinación en cada una de las especies de insectos analizados.

La traducción del motivo conservado y posterior análisis lo definieron como un dominio característico de la familia de las Peptidasas M1. La importancia dentro de la actividad peptidasa tendría que ser investigada; sin embargo, este motivo podría estar jugando un papel significativo en el modo de acción de las toxinas Cry debido a que las aminopeptidasas pueden actuar como receptores de las toxinas Cry (Gill y Ellar, 2002; Rajagopal *et al.*, 2002; Tiwesi y Wang, 2011; Zhu *et al.*, 2000). Yaoi *et al.* (1999) identificaron la región de unión en la 120 kDa APN de *B. mori* a la toxina Cry1Aa. Esta región se situaba entre Ile<sup>135</sup> y Pro<sup>198</sup> y el motivo conservado quedaba situado dentro de esta región, concretamente entre Arg<sup>176</sup> a Lys<sup>201</sup> en BmAPN (**Fig. 39**). Además, regiones muy similares en otro tipo de aminopeptidasas también han sido propuestas como regiones de unión a las toxinas Cry1A (Nakanishi *et al.*, 1999). Nakanishi *et al.* (1999) revelaron que la estructura de esta región, en la se sitúa el motivo conservado, era importante para determinar la susceptibilidad de los insectos a una determinada toxina Cry. Todo ello sugiere que el motivo conservado podría

desempeñar un papel importante en la unión de las toxinas Cry. Además, si un gen codificante para una APN de este grupo, en una determinada especie de lepidóptero, pudiera estar relacionado con la resistencia a Bt, cualquier gen ortólogo a él podría ser un candidato a ser un gen de resistencia en otras especies de lepidópteros.

El análisis con BLASTp del motivo conservado dio como resultado un listado de aminopeptidasas N pertenecientes a la Clase 1 definida en el análisis filogenético, junto con nuevas secuencias no contempladas durante la ejecución de tal análisis. En conjunto las aminopeptidasas N incluidas eran las siguientes: MsAPN120 (AAF07223), BmAPN4 (AFK85020), OnAPN1 (ACJ64827), HvAPN (AAF08254), HpAPN1 (AAF37558), HaAPN1 (AAL34109), CsAPN (ABC69855), TnAPN1 (AAX39863), AjAPN (ABE02186), SeAPN1 (AAP44964), PXAPNA (AAB70755), OfAPN1 (ACX85726), DsAPN1 (ADL38968), DpAPN1 (EHJ64338) y McAPN8 (AEA76302).

Ante los resultados de los análisis de las secuencias proponemos que el motivo conservado estaría definiendo un grupo de aminopeptidasas. De hecho, los resultados de este trabajo han mostrado como esta región está presente en un número específico de aminopeptidasas lo que, junto con los resultados filogenéticos, podría estar definiendo un grupo de secuencias de aminopeptidasas ortólogas entre sí procedentes de diferentes especies de lepidópteros.

La consistencia de este grupo de aminopeptidasas, definido por el motivo conservado, quedaría confirmado con los árboles filogenéticos publicados por otros autores (Agrawal *et al.*, 2002; Baxter *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 1999; Crava *et al.*, 2010; Emmerling *et al.*, 2001; Hua *et al.*, 1998a; Hughes, 2014; Nakanishi *et al.*, 2002; Oltean *et al.*, 1999; Rajagopal *et al.*, 2003) donde las secuencias que presentan el motivo conservado pertenecían a la Clase 1 (Baxter *et al.*, 2008; Crava *et al.*, 2010; Hughes, 2014) coincidiendo con el estudio filogenético realizado en la presente tesis.

En definitiva, el motivo conservado podría estar definiendo a un grupo de aminopeptidasas. De esta forma, ante la publicación de nuevas secuencias aminopeptídicas (de forma total o parcial) con presencia de este motivo podrían ser clasificadas directamente en la Clase 1, así como también podrían considerarse candidatos como receptores de las toxinas Cry.

#### **4. Análisis de ligamiento de las aminopeptidasas de *P. xylostella***

Con la obtención de alelos basados en polimorfismos de tamaño en las aminopeptidasas de *P. xylostella* PxAPN1\*, PxAPN2\* y PxAPNA\*, se llevó a cabo un primer estudio de ligamiento. La ausencia de polimorfismo en la PxAPN3\* hizo descartarla en el estudio.

Este estudio fue llevado a cabo mediante la elaboración de familias compuestas por dos generaciones (P y F1) a través del cruce entre individuos de la cepa susceptible LAB-PS. Los resultados se caracterizaron por la aparición de ligamiento entre las tres aminopeptidasas, aunque de forma aproximada, pues el LodScore a pesar de ser positivo tenía un valor menor de 3. En cuanto al marcador molecular STS, los estudios de ligamiento apuntaban a una ausencia de ligamiento entre éste y las tres aminopeptidasas de estudio. Al igual que antes, también se consideró como una primera aproximación pues el valor, aunque era negativo, se acercaba mucho al valor 0. La búsqueda alelismo en estas cuatro aminopeptidasas también se llevó a cabo en la cepa resistente SEL-B, obteniéndose un perfil muy parecido al encontrado en SEL-B (exceptuando que la PxAPN3 no pudo ser amplificada), lo que la convertía en una interesante cepa para estudios de ligamiento entre las aminopeptidasas de estudio y de resistencia a Cry1Ab. De hecho, se formaron diversas familias con individuos de esta cepa, pero se observó que existía muy poca reproducibilidad (datos no presentados) en la obtención de los amplificados por lo que se desestimó seguir en esta línea.

A pesar de considerar que los datos de ligamiento obtenidos con LAB-PS eran una primera aproximación, al ser comparados con el trabajo de Baxter *et al.* (2008) nos encontramos con resultados muy parecidos. Este grupo mediante un análisis de ligamiento con una cepa resistente a Cry1Ac de *P. xylostella* (llamada SC1), obtuvieron como resultado que las diferentes aminopeptidasas que aquí se analizan, estaban en un grupo de ligamiento distinto (LG11) al que se ubica el gen de resistencia frente Cry1Ac (LG22), mismo grupo de ligamiento en el que se localizaba el marcador STS (Baxter *et al.*, 2005). De esta forma, podemos decir que con nuestros resultados realmente teníamos un primer acercamiento en el estudio del ligamiento entre la secuencia STS y las aminopeptidasas en la colonia LAB-PS. Si, *a priori*, estas secuencias presentaban la misma localización genética en todas las cepas y colonias de este lepidóptero, podríamos pensar que nuestros resultados apoyaban los trabajos del grupo de Baxter.

Otros trabajos también han descartado, mediante ensayos de unión *in vitro*, la implicación de las aminopeptidasas en *P. xylostella*, al menos en el modo de acción de Cry1Ac (Higuchi *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2012). En resumen, se podría decir que, de forma general, todos los estudios hasta el momento publicados apuntan a que las aminopeptidasas no estarían involucradas en el desarrollo de resistencias frente Cry1Ac en el lepidóptero *P. xylostella*. El caso de PxAPN3 quedó por dilucidar en el trabajo de Baxter *et al.* (2008) pues no consiguieron amplificarla. En nuestro trabajo aunque sí pudimos amplificarla presentó una ausencia de polimorfismo, lo que impidió el estudio de ligamiento. Además, como se ha presentado en nuestros resultados, parece que existía un cierto alelismo o duplicidad genética que diferenciaba considerablemente entre sí las APN de clase 3 en *P. xylostella*.

En cuanto al alelismo encontrado en este trabajo en la caderina de *P. xylostella* (PxCaLP) podemos decir que podría ser empleado para genes ortólogos en otras especies de insectos lepidópteros. Ello se debe a que, hasta el momento, se ha excluido cualquier tipo de ligamiento genético entre la PxCaLP con la

resistencia en *P. xylostella* (Baxter *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2015a), ya que esta caderina quedaba situada en el LG8 y el gen de resistencia en LG22 en la cepa resistente a Cry1Ac denominada SC1. De todas maneras, no debe descartarse que las caderinas pudieran estar implicadas en el desarrollo de resistencia frente a otras toxinas Cry, por lo que el alelismo encontrado en nuestros resultados podría ser de utilidad.



## BLOQUE II. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN *Plutella xylostella*

### 1. Caracterización genética de la resistencia

Los resultados de caracterización toxicológica de la cepa SEL-B mostraron un perfil de resistencia únicamente frente a la toxina Cry1Ab, siendo susceptible frente a las toxinas Cry1Ac y Cry1Fa. La herencia de la resistencia a Cry1Ab fue autosómica recesiva. En cuanto a la susceptibilidad frente Cry1Ac y Cry1Fa la generación filial se comportó de la misma forma que los parentales, sin diferencias en cuanto a la influencia del sexo.

Mediante ensayos de unión con BBMV de SEL-B se vio una ausencia de unión Cry1Ab al ser comparada con la cepa susceptible control LAB-PS. En cambio, estas mismas BBMV presentaron unión frente a Cry1Ac lo que estaba acorde con la susceptibilidad de SEL-B para esta toxina; sin embargo, cabe resaltar que la unión mostrada de Cry1Ac fue menor que la de la cepa control LAB-PS.

El comportamiento de esta cepa resultó ser muy similar a la mostrada por la cepa PHI, origen de SEL-B. PHI, recolectada en campos de Filipinas que habían sido tratados de forma extensiva con Dipel<sup>®</sup>, fue seleccionada en laboratorio con Cry1Ab mostrando únicamente resistencia a esta toxina (Ballester *et al.*, 1994). Posteriormente, tras sucesivos procesos de selección esta cepa mostró otros perfiles de resistencia como la aparición de resistencia cruzada frente Cry1Aa y Cry1Ac (Ballester *et al.*, 1999; Tabashnik *et al.*, 1997b). Los ensayos de unión mostraron que únicamente Cry1Ab había perdido su capacidad de unión y los estudios de caracterización genética determinaron que el perfil de resistencia que mostraba era de herencia autosómica recesiva (Ballester *et al.*, 1999). La cepa SEL-B se obtuvo mediante selección con Cry1Ab a partir de PHI tras tiempo sin ser seleccionada. Con solo tres generaciones se pudo recuperar la resistencia a Cry1Ab, e incluso frente Cry1Ac y Cry1F (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001a). La

herencia de tal resistencia fue también autosómica-recesiva y presentó una pérdida de unión frente Cry1Ab y Cry1Ac. Así pues, al comparar los resultados obtenidos en la presente tesis con los del grupo de González-Cabrera *et al.*, (2001a) pudimos ver que tras un largo período sin selección, la cepa SEL-B mantuvo los niveles de resistencia y que en pocas generaciones llegó incluso a presentar los valores de SEL-B del trabajo de González-Cabrera *et al.* (2001a) ( $CL_{50}$ = 159 vs 143 mg/l); por el contrario, la resistencia frente las toxinas Cry1Ac ( $CL_{50}$ = 7.6 vs 22.7 mg/l) y Cry1F (a 10 mg/l, 11 % vs 0 % de mortalidad) se había perdido. Además, la falta de unión a BBMV de SEL-B únicamente fue observada para Cry1Ab y no para Cry1Ab y Cry1Ac tal y como mostró el trabajo de González-Cabrera *et al.* (2001a). Señalar que tanto en este trabajo como en el de González-Cabrera *et al.* (2001a) se emplearon en los bioensayos larvas de tercer estadio.

Trabajos anteriores barajaban la hipótesis de que existían al menos cuatro genes (alélicos o no) que modelaban la aparición del fenotipo de la resistencia frente las toxinas Cry en la cepa PHI y SEL-B. El primero de ellos estaría relacionado con la resistencia frente Cry1Aa sin estar afectada la unión (Tabashnik *et al.*, 1997b), el segundo frente Cry1Ab con la unión afectada (Ballester *et al.*, 1994), el tercero frente Cry1Ac sin afectar a la unión y, por último, el relacionado con la resistencia frente Cry1Ab-1Ac-1F a la vez, quedando la unión afectada (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001a). El gen que podría estar actuando en el momento que se estableció la cepa SEL-B podría ser el último de todos, pues la cepa mostraba una clara resistencia frente estas tres toxinas Cry (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001a). Sin embargo, en la cepa PHI parecía que el gen predominante era el segundo, con resistencia únicamente a Cry1Ab. El comportamiento y resultados obtenidos en esta tesis muestran como la cepa SEL-B muestra los niveles de resistencia de sus orígenes (PHI), así como el mismo tipo de herencia, por lo que el gen que podría estar actuando sería el mismo que en PHI. Además, se observó como la toxina Cry1Ac se unía a BBMV, cosa que no ocurría en los inicios de la cepa SEL-B cuando fue establecida (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001a).

El gen que podría estar actuando en la cepa SEL-B de este trabajo podría ser un gen mayor, los cuales se caracterizan por responder de forma más rápida a un proceso de selección pero que, a su vez, tienen más impacto en cuanto al coste biológico entre los individuos (Tabashnik *et al.*, 1992; Tabashnik *et al.*, 1997a). Sin embargo, la presencia de este gen mayor en los largos períodos sin presión de selección, *a priori*, no reveló indicio alguno de coste genético entre los individuos, lo que podría deberse a que las condiciones de laboratorio no tienen comparación con las condiciones ambientales adversas. Tal vez este coste genético estuvo presente durante el proceso de selección, pues la evolución que presentó fue irregular e incluso nos vimos con la necesidad de incrementar con el tiempo la concentración de Cry1Ab (**Fig. 43**), aunque esto también podría ser consecuencia de los efectos de la consanguinidad o de la deriva genética (Groeters *et al.*, 1994).

La rápida respuesta de SEL-B frente al nuevo proceso de selección sugiere que, a pesar de estar tiempo sin presión de selección, los loci de resistencia seguían presentes entre los individuos. Esta misma situación se ha dado en otras cepas de *P. xylostella* (Liu *et al.*, 1996, Perez y Shelton, 1997, Sayyed *et al.*, 2004, Tabashnik *et al.*, 1995, Tang *et al.*, 1997) o incluso en otras especies de lepidópteros como *Plodia interpunctella* (McGaughey y Beeman, 1988). Teniendo en cuenta que esta estabilidad caracteriza a SEL-B debe ser considerada como un rasgo a destacar y determinante, pues existen muchos casos en los que la resistencia es inestable o revierte tras la ausencia de presión de selección (Tabashnik *et al.*, 1994a).

En cuanto a la evolución de la resistencia durante el proceso de selección podemos decir que existe una relativa estabilidad de la resistencia en SEL-B, pues a medida que se avanzó en el proceso de selección los cambios no fueron significativamente bruscos a pesar de haber sufrido dos cuellos de botella importantes y a pesar también, de aumentar cada vez más la concentración de Cry1Ab. Este incremento de dosis de toxina fue necesario para poder emplear la cepa LAB-PS como control, ya que el perfil susceptible

de esta cepa frente esta toxina disminuía con el tiempo. En esta colonia podrían existir individuos heterocigotos con alelos de resistencia que pudieran expresarse tras el paso de generaciones tal y como se ha observado en otras cepas (Liu y Tabashnik, 1998, Tabashnik *et al.*, 1997a). También cabría la posibilidad de que esta colonia pudiera haberse contaminado con individuos resistentes de SEL-B o de otras colonias resistentes mantenidas en el interior de la misma cámara de cría. Puede que esta fuera la causa de que las generaciones F1 del cruce de individuos de distinto sexo entre SEL-B y LAB-PS, presentaran una mayor heterogeneidad.

Nuestros resultados indican que, a pesar de la variabilidad en cuanto al número de genes implicados en la aparición de resistencias frente las toxinas Cry, podría existir un gen mayor y otros menores (alelos o no) que quedarían subyacentes a éste. Estos últimos podrían ejercer su función en determinadas condiciones ambientales, o puede que únicamente desarrollen su función en condiciones de laboratorio. En otra especie de lepidóptero como es *O. nubilalis* podemos encontrar un ejemplo de cómo diferentes isoformas de una sola proteína, OnAPN, podían verse involucradas en la unión de las proteínas Cry (Crava *et al.*, 2013).

Así pues, en relación con el control integrado de plagas no debería descartarse la idea de que un solo gen tuviera la facilidad de generar diferentes alelos de resistencia los cuales, a través de las migraciones de los insectos adultos, pudieran diseminarse rápidamente.

## 2. Complementación genética de los genes de resistencia

El objetivo de los estudios de complementación genética entre las cepas resistentes, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang, fue el de conocer si las tres compartían el mismo gen de resistencia, pero con la salvedad de que, en este trabajo, se determinaría si el gen, o genes, implicados en el fenotipo de unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac a BBMV se complementaban entre sí. Este trabajo se llevaría a cabo mediante ensayos de unión tanto en los parentales como en las generaciones F1 resultado de su cruce.

Paralelamente, el grupo del Dr. Sayyed llevó a cabo los ensayos de complementación a través de bioensayos aplicando una dosis discriminante de toxina Cry1Ac de 10 µg/ml en la que herencia de la resistencia era recesiva, requisito indispensable para realizar este tipo de análisis. Los resultados que obtuvieron mostraron una ausencia de complementación, pues las generaciones F1 (obtenidas del cruce entre las tres cepas) fueron resistentes frente Cry1Ac con el mismo perfil que exhibían los parentales aunque con una salvedad en la cepa Karak. Cuando esta cepa era cruzada con Cry1Ab-SEL o Kluang la CL<sub>50</sub> de la generación F1 resultante era significativamente menor que la de los respectivos parentales. Ello sugería que Karak podría estar compartiendo únicamente algunos de los loci de resistencia con las otras dos cepas resistentes, lo que podría estar acorde con el carácter multigénico y parcialmente recesivo de la resistencia en Cry1Ab-SEL (Sayyed *et al.*, 2005) y Kluang. Estos mismos resultados también se obtuvieron para las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab pero no se dispone de los valores.

Los individuos de las distintas generaciones F1, resultado de los cruces entre las tres cepas, fueron los que se tomaron para analizar la unión frente Cry1Ab y Cry1Ac mediante la preparación de BBMV. Los resultados que se obtuvieron indicaron, de nuevo, una ausencia de complementación, ya que la falta de unión frente a estas toxinas vista en los parentales se repetía de nuevo en las

generaciones F1. La cepa susceptible empleada como control fue LAB-UK la cual presentó niveles de unión muy elevados, significativamente diferentes a los mostrados por las cepas resistentes de estudio.

Así pues, asumiendo que la falta de unión es necesaria para la toxicidad de las Cry1A, que las tres toxinas Cy1A comparten el mismo receptor (Ferre y Van Rie, 2002) y que existe un paralelismo entre la herencia de la resistencia y la pérdida de unión de Cry1Ab y Cry1Ac, podemos plantear la hipótesis de que la mutación de un mismo gen estaría modificando el sitio de unión de Cry1Ab y Cry1Ac en las tres cepas Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang.

Se puede decir que, de ambos tipos de experimentos (toxicológicos y de unión) se obtiene la misma conclusión, solo que a través de los experimentos de unión se está determinando directamente la ausencia de complementación sobre el modo de acción de las toxinas Cry, es decir, sobre su falta de unión a las membranas celulares. Sería la primera vez que, a través de ensayos bioquímicos, se realiza este tipo de estudio genético.

Así pues, tal y como hemos comentado, los resultados del presente estudio de complementación han mostrado como un solo gen era el que estaba implicado en la resistencia frente Cry1Ab y Cry1Ac en estas tres cepas, lo que no sería discordante debido a su cercanía geográfica. Estos resultados estaban acorde con el estudio toxicológico de la cepa Karak pues presentaba una resistencia unigénica frente Cry1Ac (Sayyed *et al.*, 2004), en cambio, Cry1Ab-SEL (Sayyed *et al.*, 2005) y Kluang mostraron una resistencia con un perfil multigénico frente Cry1Ac, sugiriendo que podrían ser alelos de un mismo gen. Tomando en conjunto todos estos datos, junto con los obtenidos a partir de todos los estudios en distintas cepas de *P. xylostella* como NO-QA, PEN y PHI (Tabashnik *et al.*, 1997b) o SC1 y NO-QA (Baxter *et al.*, 2005), parece que sería un gen mayor el responsable de la aparición de resistencia frente a productos Bt, incluso entre cepas separadas geográficamente. A pesar de que en determinados casos más de un alelo ha sido el responsable de la

resistencia (como en los casos de las cepas Cry1Ab-SEL y Kluang o en PHI), parece que ha sido este único gen el que ha estado asociado a la reducción de la unión de las toxinas Cry a receptores de membrana (Ferre y Van Rie, 2002). Además, en origen parece que este gen aumentó su frecuencia en diferentes poblaciones de este lepidóptero de todo el mundo debido al uso excesivo de productos Bt (Tabashnik *et al.*, 1997a, Tabashnik *et al.*, 1997b). De todas formas, al proceder la mayoría de los alelos de resistencia de un mismo gen cabría la posibilidad de que el desarrollo de resistencia en campo fuera moderado, aunque hay que tener presente que *P. xylostella* es un lepidóptero con un elevada plasticidad y con un potencial de migración importante (Furlong *et al.*, 2013), por lo que los alelos de resistencia podrían aparecer fácilmente y diseminarse con rapidez.

Con el objetivo de identificar este gen, se han desarrollado numerosos trabajos en este sentido. Una primera aproximación se llevó a cabo con el estudio del enzima MPI, el cual se correlacionaba con la resistencia a Cry1Ab en la cepa PHI (Herrero *et al.*, 2001a). Sin embargo, posteriormente se comprobó el gen *MPI* se encontraba en un grupo de ligamiento distinto (LG8) al de la resistencia (LG22) (Baxter *et al.*, 2005). También se han excluído 13 genes codificantes para distintas APN (LG11), la caderina PxCaLP (LG8) y la FAL (LG14) en la cepa SC1 de *P. xylostella* resistente a Cry1Ac (Baxter *et al.*, 2008). Trabajos más recientes apuntan a que este gen pudiera ser el transportador ABCC2 pues se ha demostrado que se encuentra ligado genéticamente a la resistencia frente Cry1Ac en la cepa NO-QA (Baxter *et al.*, 2011).

### 3. Caracterización bioquímica de la resistencia

Muchos son los trabajos que han demostrado que la falta de unión de las toxinas Cry a sitios o receptores de membrana es clave para el desarrollo de resistencias (Ferre y Van Rie, 2002). De hecho es el mecanismo de resistencia por excelencia frente las toxinas Cry1A en condiciones de campo y/o invernaderos, aunque todavía queda por conocer si también lo es en los casos de resistencias frente cultivos Bt (Baxter *et al.*, 2005).

En el caso de *P. xylostella* los ensayos de unión con toxinas Cry marcadas con NaI<sup>125</sup> han mostrado ampliamente que la falta de unión es el mecanismo clave de resistencia en numerosas cepas resistentes tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Ferre *et al.*, 1991, Ferre y Van Rie, 2002, Sayyed *et al.*, 2000, Tabashnik, 1994, Tabashnik *et al.*, 1997b, Wright *et al.*, 1997). De la misma forma, en otras especies de lepidópteros como en *Plodia interpunctella* frente Cry1Ab (Herrero *et al.*, 2001b), *Heliothis virescens* frente Cry1Fa (Jurat-Fuentes *et al.*, 2002), *Pectinophora gossypiella* (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2003), *T. ni* frente Cry1Ac (Wang *et al.*, 2007) y *Helicoverpa spp.* frente toxinas Cry2A (Caccia *et al.*, 2010) también se ha llegado a la misma conclusión.

Karak es una cepa de *P. xylostella* cuya resistencia (elevada frente Cry1Ac) fue originada directamente en plantaciones de col china en Malasia donde durante años se estuvo aplicando el producto Dipel®. En condiciones de laboratorio la resistencia de Karak frente Cry1Ac reversionó muy lentamente, de hecho se consideró que era casi estable (sin un coste biológico aparente) durante más de 11 generaciones sin presión de selección. Esta particularidad hacía de Karak una cepa de potencial interés ya que se consideraba como modelo de estudio de la resistencia en campo. Normalmente los elevados niveles de resistencia frente Bt reversionan muy rápidamente tanto si la población ha sido seleccionada en campo como si lo ha sido en laboratorio (Tabashnik *et al.*, 1994a). Un ejemplo lo tenemos con la cepa de *P. xylostella* SERD4, también



procedente de Malasia, la cual tras 12 generaciones la resistencia disminuyó muy rápidamente (Cerdea *et al.*, 2003).

Según los resultados de los ensayos de unión con la cepa Karak, ha sido la pérdida de unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac a receptores de membrana, el mecanismo de resistencia desarrollado por esta cepa. Por las características anteriormente comentadas podría ser que este mismo mecanismo de acción fuera el que actuara también en campo, aunque esto debería ser comprobado puesto que tampoco sabemos si la resistencia de esta cepa se mantendría en campo después de haber estado en condiciones de laboratorio, y tampoco se puede desechar la idea de que otros mecanismos de resistencia también pudieran estar actuando.

El nivel de resistencia de Karak frente Cry1Ca (bajo, comparado con los niveles mostrados frente las toxinas Cry1A y Cry1Fa) parecía no tener su mecanismo en la pérdida de unión de esta toxina, pues los ensayos de unión mostraron como Cry1Ca se unía de forma significativa a BBMV de Karak, aunque podría ser que esta unión fuera inefectiva. Estos resultados estaban de acuerdo con el modelo de sitios de unión propuesto para *P. xylostella*, donde Cry1Ca reconoce un sitio específico no compartido con el resto de las toxinas Cry1A (Ballester *et al.*, 1999). Así pues, cualquier alteración en la unión de las toxinas Cry1A no afectaría a la unión de Cry1Ca, ni viceversa. El menor nivel de resistencia mostrado por Karak frente Cry1Ca pudo deberse a un uso más limitado de productos basados en *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, los cuales contienen Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba, Cry1Ca y Cry1Da (Schnepf *et al.*, 1998). Estos resultados coinciden con los de otros estudios en los que también se ha visto que la resistencia frente Cry1Ca no se debía a la pérdida de unión (Liu *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2000). La ausencia de resistencia cruzada entre Cry1Ca y las toxinas Cry1A también se ha visto en otras poblaciones de *P. xylostella* procedentes de Malasia (Sayyed *et al.*, 2000, Sayyed y Wright, 2001, Wright *et al.*, 1997). Alternativamente, la presencia de unión de Cry1Ca resultó ser un control del buen estado de las BBMV de Karak.

La cepa Cry1Ab-SEL procedente de la selección con Cry1Ab de la cepa SERD4 mostró un elevado nivel de resistencia frente las toxinas Cry1A y apenas resistencia cruzada frente las toxinas Cry1Ca y Cry1D (Sayyed *et al.*, 2005). Mediante cruces entre Cry1Ab-SEL y una cepa susceptible denominada ROTH se supo que la resistencia frente Cry1Ab se caracterizaba por presentar una dominancia incompleta, multigénica y con algún gen influenciado por el sexo (Sayyed *et al.*, 2005). Los resultados de los ensayos de unión realizados en este trabajo mostraron una clara reducción de la unión específica tanto de Cry1Ab como de Cry1Ac a BBMV de Cry1Ab-SEL. En cuanto a Cry1Ca, los bajos niveles de resistencia de esta cepa frente esta toxina estaban de acuerdo con la presencia de unión específica, muy similar a la mostrada por la cepa susceptible control empleada LAB-UK. Este último resultado demostraba al mismo tiempo, como en el caso del estudio de Karak, que las BBMV se encontraban en óptimas condiciones, indicando que la ausencia de unión de Cry1Ab y Cry1Ac era real.

El modelo de receptores de las toxinas Cry establecido en *P. xylostella* (Ferre y Van Rie, 2002), sugería que la ausencia de unión de Cry1Ab incluía también la falta de unión de Cry1Ac. La cepa Cry1Ab-SEL, a pesar de ser seleccionada únicamente con Cry1Ab, desarrolló un perfil de resistencia tanto frente a Cry1Ab (3848 veces comparado con la cepa susceptible ROTH) como frente a Cry1Ac (64210 veces frente ROTH) (Sayyed y Wright, 2001). Sin embargo, el estudio completo con Cry1Ab-SEL sugería que no solamente la ausencia de unión era la causante de la resistencia en esta cepa, pues los ensayos toxicológicos con protoxina y toxina Cry1Ab daban distintos resultados, siendo esta cepa más resistente a la protoxina. Sin embargo, mediante la digestión de la protoxina Cry1Ab con el jugo gástrico extraído de las larvas no pudieron observarse diferencias significativas durante el procesado proteolítico, lo que descartaba, *a priori*, este punto como mecanismo de resistencia (Sayyed *et al.*, 2005). Como explicación alternativa se propuso la posibilidad de que otro mecanismo podría estar actuando en este mismo punto como, por ejemplo, el

secuestro de la protoxina Cry1Ab por proteasas o esterases (Gunning *et al.*, 2005, Milne *et al.*, 1995) o por una reacción inmunológica en la que determinadas moléculas serían capaces de formar agregados insolubles con las toxinas Cry (Huffman *et al.*, 2004, Ma *et al.*, 2005). Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo de resistencia denominado *shedding* en el que las APN o ALP podrían ser liberadas al lumen intestinal para secuestrar las toxinas Cry1A impidiendo su unión a membrana (Caccia *et al.*, 2012, Valaitis, 2008).

El carácter poligénico de la resistencia que mostraba esta cepa podría estar indicando que no fuera únicamente la falta de unión a membrana el mecanismo de resistencia involucrado en esta cepa. De hecho, poblaciones resistentes de campo de *P. xylostella* frente insecticidas químicos, como el fenvalerato y flufenoxuron, han mostrado un incremento de la actividad de enzimas oxidativos, como el enzima glutatión-S-transferasa, así como del metabolismo oxidativo (Mohan y Gujar, 2003). Aunque en este caso, estas poblaciones eran susceptibles a productos Bt por lo que esta respuesta enzimática podría no estar en relación con los mecanismos de resistencia frente las toxinas Cry.

El carácter parcialmente dominante de la resistencia mostrada por Cry1Ab-SEL es otro de los factores a tener en cuenta, ya que en condiciones de campo esta característica podría determinar la viabilidad de los cultivos. Habitualmente la resistencia frente Bt mostrada por los diferentes insectos plaga es de carácter recesivo, sin embargo, existen casos como en el que nos encontramos o con otros, como por ejemplo en *O. nubilalis* (Alves *et al.*, 2006, Crespo *et al.*, 2009), *H. virescens* (Gould *et al.*, 1997) o en otras poblaciones de *P. xylostella* (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001a, Liu y Tabashnik, 1997), en las que la resistencia presenta una herencia de carácter dominante. Además, es muy común en todos estos casos (como en el caso de Cry1Ab-SEL) que los valores de dominancia obtenidos representan el resultado de la combinación de todos los loci o alelos implicados en la resistencia, pues muchas de estas poblaciones la resistencia resulta ser poligénica. Normalmente el nivel de

dominancia de la resistencia es un parámetro variable dependiente de la concentración de toxinas Cry aplicadas y de las condiciones ambientales, lo que podría complicar el manejo de la resistencia en campo (Bourguet *et al.*, 1996). Sin embargo, existen estrategias para paliar este efecto como son el empleo de refugios más grandes, emplear concentraciones de toxinas Cry lo suficientemente bajas y adecuadas como para asegurar la presencia de un número substancial de individuos susceptibles o emplear refugios con elevadas dosis de toxinas para poder eliminar los individuos resistentes dominantes, aunque ello conllevaría un elevado riesgo (Tabashnik, 1994). Debe de tenerse en cuenta que estos planes de actuación podrían funcionar para retrasar o frenar el desarrollo de la resistencia pero debería de complementarse con otras estrategias como, por ejemplo, mediante un control biológico de plagas o mediante la liberación de individuos estériles (Tabashnik *et al.*, 2010).

La resistencia frente Cry1Ac mostrada por la cepa Kluang se caracterizó por ser multigénica, autosómica y de dominancia incompleta. Aunque los niveles de resistencia entre las toxinas Cry1A no presentaban diferencias significativas, el índice de resistencia relativa (en comparación con LAB-UK) era mayor frente Cry1Ac, situación muy similar a la encontrada en Karak y Cry1Ab-SEL debido seguramente al empleo masivo en campo del producto Dipel®. En este trabajo se determinó que la ausencia de unión de Cry1Ab y Cry1Ac a BBMV era el mecanismo de resistencia desarrollado en Kluang, sin embargo, al presentar una resistencia poligénica y con dominancia incompleta, como en Cry1Ab-SEL, no se descarta que otros mecanismos de resistencia también pudieran estar actuando. El hecho de que estas dos cepas hayan sido tomadas originariamente de campos ubicados en zonas de Malasia muy próximas entre sí, podría indicar que este perfil genético de la resistencia (dominancia incompleta) podría repetirse en nuevas poblaciones o que incluso los individuos pudiesen llegar a desarrollar resistencias con herencias dominantes, por lo que se debería tener en cuenta en los planes de CIP, así como en el manejo de la resistencia de *P. xylostella* en campo.

#### 4. Perfiles enzimáticos

El análisis de los marcadores enzimáticos fosfatasa alcalina (FAL),  $\gamma$ -glutamyl transferasa (GGT) y leucin aminopeptidasa (LAP) fue llevado a cabo para conocer el estado y viabilidad de las BBMV preparadas de cada una de las cepas de estudio de *P. xylostella*. Pero además, también se decidió llevar a cabo este tipo de análisis debido a que en otros estudios, como los de McNall y Adang (2003) o Jurat-Fuentes y Adang (2004), se proponía el enzima FAL como proteína involucrada en la unión de las toxinas Cry. De la misma forma, al ser las aminopeptidasas otros candidatos como receptores de las toxinas Cry (Pigott y Ellar, 2007) también resultaba de interés el análisis de esta actividad enzimática.

Así pues, al llevar a cabo el análisis de viabilidad de las BBMV preparadas de las cepas LAB-PS y SEL-B, a través de estos marcadores enzimáticos, pudo comprobarse que su estado fue óptimo. Aunque las actividades mostradas por los enzimas FAL y LAP fueron significativamente diferentes entre ambas cepas, cuando en una cepa la actividad era baja para un enzima, era elevada para la otra y viceversa. En el caso del enzima GGT los valores fueron similares en ambas cepas. Al comprobar el buen estado de las BBMV de la cepa resistente SEL-B, se corroboraba que la ausencia de unión específica mostrada frente Cry1Ab estaba actuando como mecanismo de resistencia.

En cuanto a las cepas Karak y Kluang al ser comparadas con los niveles enzimáticos de la cepa susceptible LAB-UK se obtuvo una situación idéntica a la anterior puesto que, a pesar de existir diferencias entre ellas, los niveles de actividad enzimática variaron de tal forma que cuando en una cepa la actividad para un enzima era baja para otro enzima era alta. La excepción se presentó con la cepa Cry1Ab-SEL la cual mostró bajos los niveles de actividad para los tres tipos de perfiles enzimáticos pero que, a pesar de ello, la unión frente a la toxina Cry1Ca fue similar a la mostrada por la cepa LAB-UK, lo que indicaba que tales valores no se correspondían con un mal estado de las BBMV.

Con todos estos resultados se podía llegar a la conclusión de que los valores de ausencia de unión específica, tanto para Cry1Ab como para Cry1Ac, eran correctos. Al realizar los ensayos de unión con Cry1Ca también se comprobaba, de forma paralela, la viabilidad de las BBMV; sin embargo, al obtenerse valores de unión de esta toxina un poco más bajos frente a los de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, los análisis con estos marcadores enzimáticos complementaban los resultados.

En referencia a la relación entre las actividades enzimáticas FAL, GGT y LAP y la resistencia a las toxinas Cry, podemos decir que los resultados obtenidos no daban una idea clara de que existiera una asociación entre éstas y el fenotipo resistente de las cepas SEL-B, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang. Esto fue consecuencia principalmente por el hecho de que las dos cepas susceptibles, LAB-PS y LAB-UK, diferían entre ellas para los tres tipos de actividades enzimáticas, por lo que las comparaciones con las cepas resistentes no fueron factibles. Solo se observó de forma notable que las cepas Karak y Kluang presentaban una actividad significativamente superior del enzima FAL frente a las cepas susceptibles LAB-PS y LAB-UK, pero tal y como hemos comentado, estas cepas no eran buenas cepas de referencia.

En el caso de la actividad mostrada por el enzima LAP la diferencia entre las cepas susceptibles fue muy elevada (21 veces), por lo que casi todas las cepas resistentes presentaron una actividad menor frente LAB-PS y mayor frente LAB-UK (excepto Cry1Ab-SEL). De nuevo no podía llevarse a cabo un ejercicio de comparación. La cepa Cry1Ab-SEL fue la que entre todas, presentó el nivel de actividad más bajo frente LAB-PS y similar al de la cepa susceptible LAB-UK.

En resumen, la variabilidad mostrada en todos estos resultados no permitió una clara definición de si la actividad mostrada por los enzimas FAL, GGT y LAP estaba realmente asociada con el fenotipo de la resistencia manifestada por las cuatro cepas de estudio. Las BBMV preparadas de las dos cepas susceptibles

no presentaron el mismo comportamiento frente las actividades de los enzimas FAL, GGT y LAP lo que complicaba la comparación entre los valores. Estudios como el de Valaitis (2008) con las APN de *L. dispar* y como el de Caccia *et al.* (2012) con los enzimas FAL y APN de *H. zea*, indicaban que los bajos niveles de la actividad de estos enzimas estaban asociados con la resistencia de determinadas cepas de estos lepidópteros. Proponían que la baja actividad enzimática estaba relacionada con la existencia de un proceso de liberación de estas proteínas al lumen intestinal donde actuarían como secuestradores de las toxinas Cry activadas impidiendo su unión a la membrana celular. De hecho, los niveles de estos enzimas eran mayores en el jugo gástrico de las cepas resistentes que en las susceptibles. Con los resultados de este trabajo, solo las BBMV de las cepas resistentes presentaban una menor actividad del enzima LAP frente los valores obtenidos de LAB-PS, pero eran mayores al ser comparados con los valores de LAB-UK.

En cuanto al análisis enzimático de las diferentes generaciones F1 del estudio de complementación genética con las cepas resistentes (Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang) los resultados indicaron que el estado de las BBMV fue óptimo. De hecho, aunque las BBMV preparadas a partir de individuos de las generaciones F1 «Cry1Ab-SEL x Karak» y «Karak x Kluang» dieron un nivel bajo de unión específica y también una actividad de FAL baja (lo que podría indicar que las BBMV no estaban en buenas condiciones) al analizar la unión de Cry1Ab a BBMV de estas generaciones no fue significativamente diferente al valor de unión mostrado por los parentales Karak y Kluang, en las que la actividad enzimática era mayor, por lo que de nuevo se puede decir que la baja actividad enzimática del enzima FAL de las F1 «Cry1Ab-SEL x Karak» y «Karak x Kluang» no se debía a una baja calidad de las BBMV preparadas. Por tanto, la liofilización de los individuos de las F1 no afectó a la preparación de las BBMV, pudiéndose comparar con los resultados obtenidos de BBMV preparadas a partir de individuos criogenizados (Hernandez *et al.*, 2004).

En cuanto a la relación de estos resultados con los ensayos de complementación genética, no fue posible encontrar ningún tipo de correspondencia debido a la variedad de los resultados obtenidos en cada uno de los marcadores enzimáticos. La recesividad y dominancia mostrada por cada uno de ellos dependía de la cepa, lo que impidió conocer la presencia o ausencia de complementación de los diferentes perfiles enzimáticos entre las tres cepas resistentes. Debido a tal variabilidad también se desestimó cualquier tipo de asociación entre la actividad del enzima FAL y la resistencia en estas cepas, aunque se considera necesario el desarrollo de estudios complementarios (mayor número de réplicas, determinación de esta misma actividad enzimática en cruces de cada la cepa resistente con una susceptible, determinación de la actividad en el jugo intestinal, etc.) para poder confirmar la ausencia de ligamiento entre la resistencia de estas cepas con el enzima LAP (Baxter *et al.*, 2008).



### BLOQUE III ESTUDIO DEL MECANISMO DE TOLERANCIA A TOXINAS Bt EN DIFERENTES CEPAS DEL LEPIDÓPTERO INSECTO MODELO *Bombyx mori*

#### 1. Caracterización de la unión reversible e irreversible de la toxina Cry1Ab a BBMV de *B. mori*

*B. mori* está considerado como un insecto modelo para el trabajo con lepidópteros debido a que se ha empleado en numerosos estudios en diferentes campos como la Microbiología, Fisiología y la Genética (Goldsmith *et al.*, 2005). Además, fue el primer lepidóptero en el que se secuenció todo su genoma (Mita *et al.*, 2003, Xia *et al.*, 2004). Sin embargo, no abundan mucho los estudios relacionados con la toxicidad de las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* debido a que lo que caracteriza a este lepidóptero es su tolerancia frente a las toxinas Cry (como Cry1Ab y Cry1Ac) y a los productos comerciales Bt, además no es una plaga para los cultivos agrícolas. Dentro de los pocos trabajos que hay, los estudios con la toxina Cry1Aa han mostrado que esta es la proteína Cry más activa frente a este insecto a pesar de su similitud con el resto de las Cry1A (Kim *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1992, Lu *et al.*, 1994, van Frankenhuyzen, 2009). Se ha propuesto que se debe a que, a pesar de compartir el mismo sitio de unión, la diferencia de toxicidad (por ejemplo entre Cry1Aa y Cry1Ac) radicaba en una diferencia de afinidad frente a los receptores de membrana (Lee *et al.*, 1992). En el caso de Cry1Aa y Cry1Ab la diferencia de toxicidad no residía en los parámetros de equilibrio de la unión, sino más bien en una diferencia importante en el porcentaje de unión irreversible (Ihara *et al.*, 1993).

Y es que la unión de las toxinas Cry a la membrana de las células epiteliales presenta dos componentes, una primera interacción de tipo reversible y la segunda de tipo irreversible (Lee *et al.*, 1992, Sanchis *et al.*, 1994, Van Rie *et al.*, 1990). Los ensayos de unión y de competencias con BBMV únicamente contemplan la unión total en equilibrio de las toxinas Cry sin

diferenciar entre los dos componentes de la unión (reversible e irreversible). En estos casos es necesario recurrir a los ensayos de disociación para poder determinar la contribución de cada uno de los componentes de la unión. Es bien conocido que una de las características de las toxinas Cry es la falta de correlación entre su toxicidad y la unión a las BBMV (Ferre *et al.*, 1991, Ihara *et al.*, 1993, Sanchis *et al.*, 1994, Wolfersberger, 1990). Sin embargo, esta correlación sí existe cuando nos referimos a la unión irreversible, es decir, la toxicidad está directamente relacionada con la unión irreversible de la toxina Cry a BBMV. De hecho, el grupo de Liang *et al.* (1995) mostró cómo los *ratios* de unión irreversible en BBMV de *Lymantria dispar* estaban directamente relacionados con la toxicidad de las proteínas Cry1A, más que en los parámetros de afinidad de la unión. Otros estudios demostraron como eliminando la unión irreversible a través de mutaciones dirigidas en el dominio I (Chen *et al.*, 1995, Hussain *et al.*, 1996) y el II (Rajamohan *et al.*, 1995, Rajamohan *et al.*, 1996a, Rajamohan *et al.*, 1996b, Rajamohan *et al.*, 1996c, Wu y Dean, 1996) disminuían directamente la toxicidad de las proteínas Cry1A.

En la presente tesis se eligieron dos cepas de *B. mori*, J65 y Kin, susceptibles a la toxina Cry1Ab en comparación con la cepa tolerante a C7. Considerando que la tolerancia a Cry1Ab es una característica común en las cepas de *B. mori*, las cepas susceptibles J65 y Kin fueron muy útiles para averiguar por qué las toxinas Cry son poco efectivas en determinadas especies de insectos.

Para determinar los posibles mecanismos bioquímicos que pudieran estar involucrados en la susceptibilidad de estas cepas, el grupo de liderado por el Dr. Sato (Bio-Applications and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japon) colaboró con nosotros para investigar sobre la activación proteolítica de la protoxina Cry1Ab y posteriores procesos de unión. En la presente tesis se llevaron a cabo los ensayos de unión para determinar las constantes de equilibrio y calcular el porcentaje de unión irreversible.

Los resultados de los ensayos del grupo del Dr. Sato con el contenido gastrointestinal de larvas de J65 y C7 no mostraron ninguna diferencia en cuanto a la cinética de activación proteolítica de Cry1Ab. Normalmente este mecanismo de resistencia es el que se da en los casos en los que sus niveles son bajos, cuando los niveles de resistencia son altos el mecanismo de resistencia dominante es la reducción o ausencia de unión de las toxinas Cry a receptores de membrana (Van Rie *et al.*, 1989).

En este caso, las diferencias de susceptibilidad frente Cry1Ab entre la cepa tolerante C7 y las susceptibles J65 y Kin, eran lo suficientemente elevadas como para pensar que la unión de Cry1Ab estaría afectada. Sin embargo, las tres cepas mostraron unión específica de Cry1Ab a BBMV (**Fig. 54A**), con la única diferencia de que las BBMV de la cepa Kin mostraron mayor unión inespecífica que el resto, de aproximadamente el doble.

En cuanto a las diferencias cuantitativas ( $K_d$  y  $R_t$ ), la cepa tolerante C7 y la susceptible Kin fueron las que mayor nivel de afinidad mostraron en la unión frente Cry1Ab, pero las diferencias entre los parámetros de equilibrio de la unión entre las tres cepas no fueron significativas (**Tabla 23**). Los valores de  $K_d$  obtenidos fueron muy parecidos a los publicados por otros autores para Cry1Aa y para Cry1Ab, y alrededor de 9 a 40 veces menores que los publicados para Cry1Ac (Ihara *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 1992).

Los datos obtenidos de las componentes de unión reversible/irreversible a partir de la unión total de Cry1Ab reveló una clara diferencia entre la cepa tolerante C7 y las dos susceptibles, J65 y Kin. La unión irreversible representaba un 25% de la unión total en las dos cepas susceptibles, en cambio la cepa C7 no manifestó este tipo de unión (**Fig. 59A**). Esta pérdida de irreversibilidad de la unión podría estar reflejando un mecanismo de resistencia al interferir en la inserción de la toxina Cry1Ab a membrana. Así, aunque en las BBMV de C7 se pudo ver unión en esta toxina (con la misma afinidad y  $R_t$  que en las cepas susceptibles) en realidad lo que podría estar ocurriendo es que

Cry1Ab, a pesar de unirse, no sería capaz de insertarse de forma irreversible a la membrana para llevar a término su modo de acción, esto es, la formación de poros tal y como describe Peyronnet *et al.* (1997).

Según el modelo del grupo de Bravo *et al.* (2011) se propone que la toxina Cry1Ab lleva a cabo su modo de acción en *M. sexta* a través de un proceso de unión en el que, en primer lugar, Cry1Ab se uniría débilmente al residuo de GPI anclado en los receptores ALP o aminopeptidasas. Esta unión facilitaría la concentración de las toxinas Cry1Ab en la superficie de las membranas de las células epiteliales del intestino medio. Tras este paso, la toxina Cry1Ab se uniría con mayor afinidad a la caderina, lo que facilitaría un procesado proteolítico de Cry1Ab (eliminando la hélice  $\alpha 1$  del dominio I) a la vez que se induciría la formación de oligómeros que ganarían afinidad tanto por el receptor ALP como por el de la aminopeptidasa. Tras esta última unión se facilitaría la inserción del oligómero de toxinas Cry1Ab a membrana y la formación de poros (Bravo *et al.*, 2011) con la consecuente muerte celular por choque osmótico (Knowles y Dow, 1993). La hipótesis que nosotros presentamos, tras los resultados obtenidos en la presente tesis, es que la cepa tolerante C7 a Cry1Ab podría estar diferenciándose de las susceptibles en un cambio en las aminopeptidasas. Esta hipótesis se desprende de los resultados obtenidos por el grupo del Dr. Sato en los que observaron, tras un análisis molecular de la expresión de cuatro aminopeptidasas (BmAPN1, BmAPN2, BmAPN3 y BmAPN4) y de la caderina BtR175, que había una reducción de 2 a 4 veces la cantidad de BmAPN1 en la cepa C7. Los análisis de ligand blot indicaron que Cry1Ab se unía mayoritariamente a las bandas de 195 kDa correspondiente a la caderina BtR175 y a la de 115 kDa correspondiente a la BmAPN1, y no al resto de aminopeptidasas (datos cedidos). Además, la elevada toxicidad de la proteína Cry1Ab en la cepa J65 se debía a la unión de la proteína a membrana y no a una pérdida de la actividad de activación de la protoxina ni a una actividad de degradación, o de secuestro, de la proteína en el lumen intestinal. Estos resultados fueron obtenidos también gracias a este grupo de investigación los cuales, mediante la incubación *in vitro* de células del epitelio

intestinal de J65 con Cry1Ab, vieron como estas células sufrían un proceso de lisis osmótica (apartado 1.2 de Material y Métodos) (Ibiza-Palacios *et al.*, 2008).

No se descarta que la aparente disminución en la expresión de la proteína BmAPN1 estuviera relacionada con la tolerancia de la cepa C7 a la toxina Cry1Ab a través de una pérdida de unión irreversible. Pero un nivel de CL<sub>50</sub> de 10000 µg/g no puede explicarse únicamente con esta pequeña diferencia de expresión de la BmAPN1. Aunque es verdad que diversos estudios sugieren que entre las diferentes isoenzimas de aminopeptidasa, la BmAPN1 es la candidata a ser el receptor de las toxinas Cry. Por ejemplo, la transformación de *D. melanogaster* con el gen de la MsAPN1 de *M. sexta* hizo de las larvas de este díptero se convirtieran en susceptibles a la toxina Cry1Ac (Gill y Ellar, 2002). Otros ejemplos los tenemos con los trabajos de Herrero *et al.* (2005) y de Tiewhiri y Wang (2011). En el primero, se vio mediante Northern blot, como la cepa resistente a Cry1C de *Spodoptera exigua* perdía completamente la expresión del gen *apn1*; en el segundo, se comprobó la implicación de la TnAPN1 como receptor de Cry1Ac en *T. ni* al observar como su expresión estaba mermaba en una cepa resistente de este lepidóptero.

Así pues, a pesar de que la BmAPN1 pudiera estar involucrada en el modo de acción de la toxina Cry1Ab en *B. mori*, se propone que debía de existir un mecanismo post-unión que realmente fuera clave en la actividad tóxica de Cry1Ab. En este sentido, y según los resultados obtenidos, se propone que el porcentaje de unión reversible o irreversible era el que limitaba el nivel de toxicidad, puesto que este trabajo ha definido por primera vez que la tolerancia-resistencia a la toxina Cry1A estaría directamente relacionada con la reversibilidad de la unión.

A modo de comparación con el trabajo de Ihara *et al.* (1993), nuestros resultados mostraron que los niveles de unión de la toxina Cry1Ab en J65 fueron más bajos que los presentados por este grupo (6% vs. 20%) además, se necesitaba más tiempo (100 vs. 40 min) para poder llegar a este nivel. Sin

embargo, Ihara *et al.* (1993) observaron niveles de unión irreversible que son muy similares a los obtenidos en esta tesis (1.6% vs. 1.8%) pero que representaban un menor porcentaje del total de la unión específica que la que representan nuestros datos (1.6% de 20% vs. 1.8% de 6%). Estas diferencias podrían deberse a diferencias en los protocolos y materiales empleados, e incluso a diferencias en las cepas de ensayo de *B. mori* que se han usado en cada estudio. De todas formas, el hecho de que la unión irreversible representara un mayor porcentaje de la unión específica total en la cepa J65 que en las cepas de estudio de Ihara *et al.* (1993), podía sugerir que J65 fuera una cepa más susceptible a Cry1Ab.

Trabajos más recientes, como el de Caccia *et al.* (2012) muestran como una cepa susceptible de *H. zea* a Cry1Ac presentaba la totalidad de la unión a esta toxina de forma irreversible, mientras que la cepa resistente presentaba parte de la unión reversible junto con una disminución de la actividad de la aminopeptidasa y la ALP. En el trabajo de Atsumi *et al.* (2012) a pesar de involucrar el transportador ABCC2 como responsable del fenotipo resistente a Cry1Ab en *B. mori*, observaron que el porcentaje de unión a BBMV era igual entre cepas resistentes y susceptibles, por lo que la diferencia podría ser debida a variaciones en la unión reversible/irreversible que condicionaran la susceptibilidad de este lepidóptero. Tanaka *et al.* (2013), a través de ensayos de citotoxicidad, también definen el complejo proteico ABCC2 como responsable de la lisis de células transformadas Sf9 en contacto con la toxina Cry1Ab, encontrando diferencias significativas en el comportamiento de este complejo en función de la cepa de procedencia (susceptible o resistente) de *B. mori*. Este grupo, mostró además, cómo ABCC2 y la caderina BtR175 actuaban de forma sinérgica incrementando la susceptibilidad de las células transformadas lo que podría estar acorde con que el tipo de unión de ambas proteínas fuera de carácter reversible. Resultados similares fueron obtenidos con la caderina de *H. armigera* y el complejo ABCC2 de *S. litura* (Chen *et al.*, 2015).

Hasta el momento, la gran mayoría de trabajos relacionaban la unión irreversible de las Cry1 de forma independiente a la naturaleza de las cepas de insectos empleadas (Chen *et al.*, 1995, Hussain *et al.*, 1996, Ihara *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 1992, Liang *et al.*, 1995, Rajamohan *et al.*, 1995, Rajamohan *et al.*, 1996b, Rajamohan *et al.*, 1996c, Wu y Dean, 1996). Los resultados aquí presentados serían los primeros en involucrar los perfiles de susceptibilidad/resistencia de una cepa frente las toxinas Cry con el porcentaje de irreversibilidad de su unión. De esta forma, se estaría involucrando un proceso post-unión como mecanismo de resistencia frente a las toxinas Cry. Además, los ensayos de asociación con Cry1Ab de este estudio se llevaron a cabo empleando BBMV en solución, lo que permitía obtener mejores resultados que los obtenidos por otros autores con la técnica de SPR (Jenkins y Dean, 2001).

## **2. Moléculas implicadas en la unión de Cry1Ab en la cepa J65 de *B. mori***

Las diferentes especies de *B. mori* suelen ser tolerantes a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac y susceptibles a Cry1Aa. Sin embargo, las toxicidades relativas de Cry1Aa y Cry1Ab o Cry1Ac varían bastante según el estudio al que nos refiramos (Ge *et al.*, 1989, Gringorten, 2001, Kim *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1992, Masson *et al.*, 1994).

La cepa J65 de *B. mori* fue la empleada para determinar qué moléculas eran las que estaban implicadas en la unión de Cry1Ab. Como ya se ha adelantado anteriormente, se trata de una cepa susceptible tanto a Cry1Ab como a Cry1Aa. Otros autores han encontrado cepas con similar susceptibilidad, aunque con una toxicidad 10 veces menor de Cry1Ab (Ihara *et al.*, 1993).

El bloqueo de la unión de la toxina Cry1Ab en BBMV de J65 mediante anticuerpos permitió identificar las moléculas que intervienen en el proceso de unión. Diferentes trabajos, a través de técnicas desnaturalizantes, han

demostrado que la toxina Cry1Ab podía unirse a las caderinas, es el caso de la caderina BtR1 de *M. sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1995) o la OnBtR1 de *O. nubilalis* (Flannagan *et al.*, 2005). Sin embargo, no hay ningún estudio que relacione la unión específica de Cry1Ab con la caderina BtR175 de *B. mori*. Únicamente el trabajo de Tanaka *et al.* (2013), a través de ensayos de citotoxicidad, mostraron que esta caderina aumentaba la susceptibilidad de las células Sf9 junto con el transportador BmABCC2. A través de los resultados que presentamos en esta tesis, se ofrece una prueba de que la caderina BtR175 desempeña un papel importante en la actividad tóxica de las toxinas Cry1A en *B. mori*. De forma indirecta, se comprueba que Cry1Ab se une a la BmAPN1 y a la caderina BtR175 en una solución de BBMV puesto que, cuando las BBMV de la cepa J65 fueron incubadas con los anticuerpos anti-BmAPN1 y anti-BtR175, se obtuvieron cambios significativos en los datos de unión al ser comparados con los controles (**Fig. 61**). La caderina BtR175 fue la principal responsable de la unión reversible y la BmAPN1 fue la única involucrada en la unión irreversible (con la BmAPN3 no se obtuvieron cambios significativos respecto a los controles) pues al bloquear la caderina con anti-BtR175 la unión de Cry1Ab desaparecía casi al completo (**Fig. 61**), mostrando que no existía ningún otro receptor involucrado en la unión. Trabajos como el de Nagamatsu *et al.* (1999), en el que mediante la incubación de BBMV con anticuerpos anti-BtR se conseguía inhibir la unión de Cry1Aa, apoyan nuestros resultados, ya que aun siendo con una proteína distinta, el modelo de receptores demuestra que Cry1Aa y Cry1Ab comparten el mismo sitio de unión (Ferre y Van Rie, 2002).

De todas formas, creemos que se necesitan nuevos ensayos *in vivo* que puedan corroborar esta conclusión, ya que según se viene viendo en diferentes trabajos depende del estudio y de la metodología empleada se obtienen un tipo de resultados u otros. Además, puede que el modelo de receptores que proponemos en *B. mori* no sea válido para otras especies de lepidópteros, por ejemplo en *P. xylostella* la caderina, aminopeptidasas y ALP quedan excluidas de actuar como receptores de las toxinas Cry al estar en grupos de ligamiento distintos de donde se encuentra el gen de la resistencia a Cry1Ac (Baxter *et al.*,



2005, Baxter *et al.*, 2008) o como en *T. ni* cuya resistencia a Cry1Ac no estaba ligada genéticamente con la caderina (Zhang *et al.*, 2012). Además, se ha empleado una cepa de *B. mori* (J65) susceptible a Cry1Ab, lo que es poco habitual en este insecto, por lo que el desarrollo de este fenotipo puede haberse originado por otra vía que no es la actualmente conocida.

Tras los resultados obtenidos con estos experimentos podemos decir que cumplirían, en parte, con el modo de acción de la toxina Cry1Ab propuesto por Bravo *et al.* (2011). En este modelo se propone que la toxina Cry1Ab, en *M. sexta*, se uniría inicialmente y de forma débil a los receptores MsAPN y/o ALP. Esta unión facilitaría la concentración de las toxinas Cry1Ab en la superficie de las membranas de las células epiteliales del intestino medio. Tras este paso, la toxina Cry1Ab se uniría con mayor afinidad a la caderina, lo que facilitaría un procesado proteolítico de Cry1Ab eliminando la hélice  $\alpha 1$  del dominio I a la vez que se induciría la formación de oligómeros que ganarían afinidad tanto por el receptor ALP como por el de MsAPN. Tras esta última unión se facilitaría la inserción del oligómero de toxinas Cry1Ab a membrana y la formación de poros (Bravo *et al.*, 2011) con la consecuente muerte celular por choque osmótico (Knowles y Dow, 1993). Podríamos considerar pues que la unión a la caderina es de carácter reversible, ya que es el paso que reconduce a la toxina Cry a la APN y así formar el poro, y la unión a la APN de carácter irreversible porque es un paso que debe de necesitar de estabilidad para que la lisis celular pueda llevarse a cabo. El hecho de que digamos que en parte se puede cumplir este modo de acción se debe a que, según los resultados obtenidos, el primer paso de unión a APN/ALP no se llevaría a cabo, ya que al bloquear la unión de la caderina prácticamente desaparece la unión específica de Cry1Ab. Esta situación podría ser consecuencia del bloqueo de este paso con anti-BtR175, la toxina Cry1Ab no sería procesada proteolíticamente, por lo que se impediría la formación de oligómeros y con ello la unión a la BmAPN1 o ALP. Esta situación implicaría a la BmAPN1 de forma exclusiva en el modo de acción de Cry1Ab, lo que estaría acorde con el modelo de Bravo *et al.* (2011) en el que la 120-kDa APN de *M. sexta* está implicada y

es homóloga a la BmAPN1 (Crava *et al.*, 2010, Herrero *et al.*, 2005, Hughes, 2014). Además, estaríamos demostrando que la BmAPN1 estaría implicada en el proceso tóxico de Cry1Ab que hasta el momento no se había visto.

En el caso de bloquear la BmAPN1 con anti-BmAPN1 la unión total observada era prácticamente de carácter reversible lo que estaría acorde con la implicación de la caderina BtR175 en este tipo de unión. Ante las publicaciones recientes (Gahan *et al.*, 2010, Baxter *et al.*, 2011, Tanaka *et al.*, 2013) no descartamos que el receptor BmABCC2 pudiera estar también implicado en este punto de unión, ofreciendo un proceso de unión reversible, aunque también podría estar actuando como un sistema de detoxificación del insecto frente las toxinas Cry. En cuanto a la ALP sugerimos que su implicación en el modo de acción de Cry1Ab en *B. mori* no estaría clara ya que, como se ha comentado anteriormente, al bloquear la BmAPN1 la unión obtenida era de carácter reversible, por lo que si la ALP presenta una función de receptor como BmAPN1, la unión obtenida en el ensayo debería de haber sido de carácter irreversible.



## VI. CONCLUSIONES

1. La posición y tamaño de los intrones secuenciados de las aminopeptidasas N: PxAPN1, PxAPN2, PxAPN3 y PxAPNA, de *Plutella xylostella* presentaban cierta homología entre ellos, siendo más similares entre las PxAPN1-PxAPN2 y entre las PxAPN3-PxAPNA. Ello estaba acorde con la posición de los grupos filogenéticos en los que quedaban agrupadas, puesto que la distancia filogenética era menor entre las PxAPN1 y PxAPN2 y entre las PxAPN3 y PxAPNA.
2. Se considera que la secuencia genómica parcial PxAPN3\* junto con la secuencia publicada PxAPN3 proceden de la duplicación de un mismo gen ancestral, por lo que podrían presentar incluso diferencias en cuanto a su función como aminopeptidasas N en *P. xylostella*.
3. Del análisis filogenético de las aminopeptidasas N se dedujo como las de Clase 2 se situaban a una distancia filogenética mayor al resto de clases. De esta forma, el filograma mostraba tres grandes grupos, el constituido por las aminopeptidasas de Clase 2, el formado por las de Clase 7, 5 y 6, y el que agrupaba las clases 4 y 8.
4. El motivo conservado de las aminopeptidasas N era característico de las APN de Clase 1. Su posición flanqueante a un intrón podría estar relacionada con el proceso de *splicing* en este grupo de aminopeptidasas ortólogas. Se propone que podría desempeñar un papel importante en el modo de acción de las toxinas Cry debido a que

es característico de un determinado número de aminopeptidasas, y a que otros autores lo sitúan en la región de unión de las toxinas Cry1A.

5. La ausencia de ligamiento entre las PxAPN1, PxAPN2 y PxAPNA, así como frente a la secuencia STS indicaba que en *P. xylostella* las aminopeptidasas N no estarían involucradas en el modo de acción de las toxinas Cry1A.
6. La cepa SEL-B de *P. xylostella* se caracterizó por ser resistente a la toxina Cry1Ab y susceptible a Cry1Ac y Cry1Fa. La resistencia frente Cry1Ab fue de carácter autosómico recesivo. La falta de unión específica de Cry1Ab resultó ser el mecanismo de resistencia de esta cepa.
7. Debido a la rapidez respuesta de la cepa SEL-B en recuperar los niveles de resistencia tras un largo período sin presión de selección, y a los perfiles de toxicidad y unión de las toxinas Cry, se considera que un único gen estaría involucrado en la resistencia de esta cepa. Esta situación era análoga a la que ocurría en origen con la cepa PHI. No se descarta que otros genes menores (alelos o no) también pudieran estar presentes, facilitando a la cepa su dispersión mediante el desarrollo de resistencias frente a nuevas toxinas.
8. La pérdida de unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac a receptores de membrana fue el mecanismo de resistencia desarrollado por las cepas Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang de *P. xylostella* frente a estas toxinas. A través de estos mismos ensayos se dedujo la ausencia de complementación entre los genes responsables de la unión de estas toxinas.
9. Las actividades enzimáticas obtenidas de los marcadores enzimáticos FAL y LAP fueron tan variables entre las cuatro cepas resistentes:

SEL-B, Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang que no permitió encontrar ningún tipo de asociación con el fenotipo de la resistencia. Los mismos resultados se obtuvieron con los ensayos de complementación de la ausencia de unión de Cry1Ab y Cry1Ac a BBMV de la cepas Karak, Cry1Ab-SEL y Kluang, por lo que no se pudo conocer si existía correspondencia entre la falta de complementación genética de la resistencia con la actividad mostrada por estos marcadores enzimáticos.

10. A pesar de las diferencias de susceptibilidad frente Cry1Ab entre la cepa tolerante C7 y las susceptibles J65 y Kin, las tres mostraron presencia de unión específica a esta toxina. Los resultados obtenidos han demostrado que existe un mecanismo de resistencia posterior a la unión de la toxina Cry1Ab, correspondiente a una ausencia de unión irreversible en la cepa tolerante C7 y de presencia de unión reversible/irreversible en las cepas J65 y Kin.
  
11. En la cepa J65 se observó cómo la caderina BtR175 era la principal responsable de la unión reversible y la BmAPN1 era la única involucrada en la unión irreversible, pues al bloquear la caderina con anti-BtR175 la unión de Cry1Ab desaparecía casi al completo mostrando que no existía otro receptor implicado en la unión. No se descarta que otras moléculas pudieran estar actuando como receptores a través de un tipo de unión reversible.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

Adang, M.J. & Spence, K.D. (1981) Surface morphology of peritrophic membrane formation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Cell Tissue Res.* 218, 141-147.

Afify, A.M. & Matter, M.M. (1969) Retarded effect of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) on the fecundity of *Anagasta kuehniella* (Zell.). *Entomophaga* 14, 447-456.

Agaisse, H. & Lereclus, D. (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177, 6027-6032.

Agrawal, N., Malhotra, P. & Bhatnagar, R.K. (2002) Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4583-4592.

Aimanova, K.G., Zhuang, M. & Gill, S.S. (2006) Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 178-187.

Allen, R.C., Rogelj, S., Cordova, S.E. & Kieft, T.L. (2006) An immuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J. Immunol. Methods* 308, 109-115.

Alves, A.P., Spencer, T.A., Tabashnik, B.E. & Siegfried, B.D. (2006) Inheritance of resistance to the Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 99, 494-501.

Al-yahyaee, S.A. & 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.



- Andersen, G.L., Simchock, J.M. & Wilson, K.H. (1996) Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol.* 178, 377-384.
- Andow, D.A. & Alstad, D.N. (1998) F2 screening for rare resistance alleles. *J. Econ. Entomol.* 91, 572-578.
- Andreadis, S.S., Alvarez-Alfageme, F., Sanchez-Ramos, I., Stodola, T.J., Andow, D.A., Milonas, P.G., Savopoulou-Soultani, M. & Castanera, P. (2007) Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAb in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 100, 195-201.
- Angst, B.D., Marcozzi, C. & Magee, A.I. (2001) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell. Sci.* 114, 629-641.
- Ankersmit, G.W. (1953) DDT-resistance in *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lep.) in Java. *Bull. Entomol. Res.* 44, 421-425.
- Aronson, A.I., Beckman, W. & Dunn, P. (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50, 1-24.
- Aronson, A.I., Wu, D. & Zhang, C. (1995) Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* 177, 4059-4065.
- Aronson, A.I., Geng, C. & Wu, L. (1999) Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2503-2507.
- Aronson, A.I. & Shai, Y. (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 1-8.
- Ash, C., Farrow, J.A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. & Collins, M.D. (1991) Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 343-346.
- Atsumi, S., Miyamoto, K., Yamamoto, K., Narukawa, J., Kawai, S., Sezutsu, H., Kobayashi, I., Uchino, K., Tamura, T., Mita, K., Kadono-Okuda, K., Wada, S., Kanda, K., Goldsmith, M.R. & Noda, H. (2012) Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E1591-8.

- Avisar, D., Keller, M., Gazit, E., Prudovsky, E., Sneh, B. & Zilberstein, A. (2004) The role of *Bacillus thuringiensis* Cry1C and Cry1E separate structural domains in the interaction with *Spodoptera littoralis* gut epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 15779-15786.
- Ballester, V., Escriche, B., Mensua, J.L., Riethmacher, G.W. & Ferre, J. (1994) Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to CryIA(b). *Biocontrol Sci. and Technol.* 4, 437-443.
- Ballester, V., Granero, F., Tabashnik, B.E., Malvar, T. & Ferre, J. (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.
- Banks, D.J., Jurat-Fuentes, J.L., Dean, D.H. & 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.
- Baxter, S.W., Zhao, J.Z., Gahan, L.J., Shelton, A.M., Tabashnik, B.E. & Heckel, D.G. (2005) Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in *Plutella xylostella*. *Insect Mol. Biol.* 14, 327-334.
- Baxter, S.W., Zhao, J.Z., Shelton, A.M., Vogel, H. & Heckel, D.G. (2008) Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 125-135.
- Baxter, S.W., Badenes-Perez, F.R., Morrison, A., Vogel, H., Crickmore, N., Kain, W., Wang, P., Heckel, D.G. & Jiggins, C.D. (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera. *Genetics* 189, 675-679.
- Becker, N. (2000) Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. eds. J.F. Charles, A. Delecluse & C. Nielsen-LeRoux, pp. 383. Dordrecht (Holland):Kluwer Academic Publishers.
- Beebe, T., Korner, A. & Bond, R.P. (1972) Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerases by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. The direct observation of nucleoplasmic ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei. *Biochem. J.* 127, 619-634.
- Bel, Y. & Escriche, B. (2006) Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes. *Gene* 381, 71-80.

- Berliner, E. (1915) Ueber die schlafsucht der *Ephesia kuhniella* und *Bac. thuringiensis* n. sp. *Z. Angew Entomol.* 2, 21-56.
- Bietlot, H.P., Vishnubhatla, I., Carey, P.R., Pozsgay, M. & Kaplan, H. (1990) Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 267, 309-315.
- Bone, L.W. (1989) Activity of commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrongylus colubriformis* and *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 53, 276-277.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J. & Li, J. (2005) Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363-382.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C. & Lescar, J. (2006) Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* 188, 3391-3401.
- Bosch, D., Schipper, B., van der Kleij, H., de Maagd, R.A. & Stiekema, W.J. (1994) Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Biotechnology (N. Y)* 12, 915-918.
- Bourguet, D., Prout, M. & Raymond, M. (1996) Dominance of insecticide resistance presents a plastic response. *Genetics* 143, 407-416.
- Bourguet, D., Genissel, A. & Raymond, M. (2000) Insecticide resistance and dominance levels. *J. Econ. Entomol.* 93, 1588-1595.
- Bourque, S.N., Valero, J.R., Lavoie, M.C. & Levesque, R.C. (1995) Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1623-1626.
- 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.
- Bradley, D., Harkey, M.A., Kim, M.K., Biever, K.D. & 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., Hendrickx, K., Jansens, S. & Peferoen, M. (1992) Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 247-253.
- Bravo, A. (1997) Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179, 2793-2801.
- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S. & Soberon, M. (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1667, 38-46.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S. & Soberon, M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423-431.
- Bravo, A., Gomez, I., Porta, H., Garcia-Gomez, B.I., Rodriguez-Almazan, C., Pardo, L. & Soberon, M. (2013) Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb. Biotechnol.* 6, 17-26.
- Brevault, T., Heuberger, S., Zhang, M., Ellers-Kirk, C., Ni, X., Masson, L., Li, X., Tabashnik, B.E. & Carriere, Y. (2013) Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5806-5811.
- Burges, H.D., Hillyer, S. & Chanter, D.O. (1975) Effect of ultraviolet and gamma rays on the activity of delta-endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 25, 5-9.
- Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J. & 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.
- Butko, P. (2003) Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2415-2422.
- Caccia, S., Hernandez-Rodriguez, C.S., Mahon, R.J., Downes, S., James, W., Bautsoens, N., Van Rie, J. & Ferre, J. (2010) Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. *PLoS One* 5, e9975.

- Caccia, S., Moar, W.J., Chandrashekhar, J., Oppert, C., Anilkumar, K.J., Jurat-Fuentes, J.L. & Ferre, J. (2012) Association of Cry1Ac toxin resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie) with increased alkaline phosphatase levels in the midgut lumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5690-5698.
- Campbell, J.B., Berry, I.L., Boxler, D.J., Davis, R.L., Clanton, D.C. & Deutscher, G.H. (1987) Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gain and feed efficiency of feedlot cattle. *J. Econ. Entomol.* 80, 117-119.
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P. & Bulla, L.A., Jr, (2003) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 2, 19-28.
- Carlberg, G., Kihamia, C.M. & Minjas, J. (1985) Microbial control of flies in latrines in Dares Salaam with a *Bacillus thuringiensis* (serotype 1) preparation, Muscabac. *MIRCEN Journal of Applied Microbiological Biotechnology* 1, 33-44.
- Carlberg, G. (1986) *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. *MIRCEN Journal of Applied Microbiological Biotechnology* 2, 267-274.
- Carrier, M.F. (1990) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv. Biophys.* 26, 51-73.
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. & Koziel, M.G. (1991) Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3057-3061.
- Carriere, Y. & Tabashnik, B.E. (2001) Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proc. Biol. Sci.* 268, 1475-1480.
- Carvalho, A.B. & Clark, A.G. (1999) Intron size and natural selection. *Nature* 401, 344.
- Cerda, H., Sayyed, A.H. & Wright, D.J. (2003) Laboratory culture conditions affect stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae). *J. Appl. Entomol.* 127, 142-145.
- Chang, W.X., Gahan, L.J., Tabashnik, B.E. & Heckel, D.G. (1999) A new aminopeptidase from diamondback moth provides evidence for a gene duplication event in Lepidoptera. *Insect Mol. Biol.* 8, 171-177.
- Chang, X., Wu, Q., Wang, S., Wang, R., Yang, Z., Chen, D., Jiao, X., Mao, Z. & Zhang, Y. (2012) Determining the involvement of two aminopeptidase Ns in the resistance of *Plutella xylostella* to the Bt toxin Cry1Ac: cloning and study of in vitro function. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 26, 60-70.

- Chen, J., Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L., Abdullah, M.A. & Adang, M.J. (2007) Synergism of *Bacillus thuringiensis* toxins by a fragment of a toxin-binding cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13901-13906.
- Chen, J., Aimanova, K.G., Fernandez, L.E., Bravo, A., Soberon, M. & Gill, S.S. (2009) *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. J.* 424, 191-200.
- Chen, X.J., Curtiss, A., Alcantara, E. & Dean, D.H. (1995) Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270, 6412-6419.
- Chen Z, He F, Xiao Y, Liu C, Li J, Yang Y, Ai H, Peng J, Hong H, Liu K. (2015) Endogenous expression of a Bt toxin receptor in the Cry1Ac-susceptible insect cell line and its synergistic effect with cadherin on cytotoxicity of activated Cry1Ac. *Insect Biochem Mol Biol.* In press
- Cherry, R. (1993) Sericulture. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 35, 83-84.
- Choma, C.T., Surewicz, W.K., Carey, P.R., Pozsgay, M., Raynor, T. & Kaplan, H. (1990) Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *Eur. J. Biochem.* 189, 523-527.
- Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M. & Zaritsky, A. (2008) High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Mol. Biol.* 380, 820-827.
- Coleman, J.E. (1992) Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 441-483.
- Contreras, E., Schoppmeier, M., Real, M. D. & Rausell, C. (2013) Sodium solute symporter and cadherin proteins act as *Bacillus thuringiensis* Cry3Ba toxin functional receptors in *Tribolium castaneum*. *J. Biol. Chem.* 288, 18013–18021.
- Crava, C.M., Bel, Y., Lee, S.F., Manachini, B., Heckel, D.G. & Escriche, B. (2010) Study of the aminopeptidase N gene family in the lepidopterans *Ostrinia nubilalis* (Hubner) and *Bombyx mori* (L.): sequences, mapping and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 506-515.
- Crava, C.M., Bel, Y., Jakubowska, A.K., Ferre, J. & Escriche, B. (2013) Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 924-935.

- Crespo, A.L., Spencer, T.A., Alves, A.P., Hellmich, R.L., Blankenship, E.E., Magalhaes, L.C. & Siegfried, B.D. (2009) On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Pest Manag. Sci.* 65, 1071-1081.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, D.H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807-813.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. & Zeigler, D.R. (2014) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.
- Daffonchio, D., Raddadi, N., Merabishvili, M., Cherif, A., Carmagnola, L., Brusetti, L., Rizzi, A., Chanishvili, N., Visca, P., Sharp, R. & Borin, S. (2006) Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1295-1301.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 317-64, table of contents.
- de Banjac, H. & Bonnefoi, A. (1962) Essai de classification biochemique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* de type *B. thuringiensis*. *Entomophaga* 1, 31.
- de Maagd, R.A., Bakker, P.L., Masson, L., Adang, M.J., Sangadala, S., Stiekema, W. & Bosch, D. (1999) Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 31, 463-471.
- de Maagd, R.A., Weemen-Hendriks, M., Stiekema, W. & 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 Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. & Schnepf, H.E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37, 409-433.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.J., Chen, X.J., Alcantara, E. & 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. & 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.
- Dermauw, W. & Van Leeuwen, T. (2014) The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45C, 89-110.
- Dong, H.Z. & Li, W.J. (2007) Variability of Endotoxin Expression in Bt Transgenic Cotton. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193, 21-29.
- Dorrell, N., Hinchliffe, S.J. & Wren, B.W. (2005) Comparative phylogenomics of pathogenic bacteria by microarray analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 620-626.
- Dorsch, J.A., Candas, M., Griko, N.B., Maaty, W.S., Midboe, E.G., Vadlamudi, R.K. & Bulla, L.A., Jr, (2002) Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R(1) in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1025-1036.
- Du, C., Martin, P.A. & Nickerson, K.W. (1994) Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3847-3853.
- Dulmage, H.T. (1970) Production of the spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 16, 385-389.
- Dworzanski, J.P., Dickinson, D.N., Deshpande, S.V., Snyder, A.P. & Eckenrode, B.A. (2010) Discrimination and phylogenomic classification of *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* strains based on LC-MS/MS analysis of whole cell protein digests. *Anal. Chem.* 82, 145-155.
- Eguchi, M. (1995) Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 111, 151-162.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Martlbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M. & Scherer, S. (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 151, 183-197.



- Elliot, S.L., Blanford, S. & Thomas, M.B. (2002) Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proc. Biol. Sci.* 269, 1599-1607.
- Emmerling, M., Chandler, D. & Sandeman, M. (2001) Molecular cloning of three cDNAs encoding aminopeptidases from the midgut of *Helicoverpa punctigera*, the Australian native budworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 899-907.
- Engels, H., Bourguet, D., Cagan, L., Manachini, B., Schuphan, I., Stodola, T.J., Micoud, A., Brazier, C., Mottet, C. & Andow, D.A. (2010) Evaluating resistance to Bt toxin Cry1Ab by F2 screen in European populations of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.*, 103, 1803-1809.
- Escriche, B., Tabashnik, B.E., Finson, N. & Ferre, J. (1995) Immunohistochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella* (L.) from Hawaii. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 388-395.
- Escriche, B., Ferrandis, M.D., Hernandez, C.S., Herrero, S., Martinez, C. & Porcar, M. (2001) Técnicas básicas en el trabajo con *Bacillus thuringiensis*. In: *Bioinsecticidas: Fundamentos Y Aplicaciones de Bacillus Thuringiensis En El Control Integrado De Plagas*. eds. P. Caballero & J. Ferre, pp. 297-318. Valencia:Phytoma-España, S., L.; Universidad Pública de Navarra.
- Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D. & Sanchis, V. (2003) Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 47, 501-507.
- Estada, U. & Ferre, J. (1994) Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3840-3846.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A. & 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.U.S.A* 93, 5389 - 5394.
- Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M.D., Morris, K., Oppert, B. & Jurat-Fuentes, J.L. (2009) A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J. Biol. Chem.* 284, 18401-18410.
- Fang, J., Xu, X., Wang, P., Zhao, J.Z., Shelton, A.M., Cheng, J., Feng, M.G. & Shen, Z. (2007) Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 956-961.

- Fang, S., Wang, L., Guo, W., Zhang, X., Peng, D., Luo, C., Yu, Z. & Sun, M. (2009) *Bacillus thuringiensis* bel protein enhances the toxicity of Cry1Ac protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5237-5243.
- Federici, B.A., Park, H.W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C. & Johnson, J.J. (2003) Recombinant bacteria for mosquito control. *J. Exp. Biol.* 206, 3877-3885.
- Feitelson, J.S., Payne, J. & Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology* 10, 271-275.
- Fernandez, L.E., Perez, C., Segovia, L., Rodriguez, M.H., Gill, S.S., Bravo, A. & Soberon, M. (2005) Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II. *FEBS Lett.* 579, 3508-3514.
- Fernandez, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A. & Soberon, M. (2006) A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394, 77-84.
- Fernandez, L.E., Martinez-Anaya, C., Lira, E., Chen, J., Evans, A., Hernandez-Martinez, S., Lanz-Mendoza, H., Bravo, A., Gill, S.S. & Soberon, M. (2009) Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry* 48, 8899-8907.
- Ferre, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5119-5123.
- Ferre, J. & Van Rie, J. (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533.
- Finney, D.J. (1972) *Probit Analysis* Cambridge University (UK).
- Flannagan, R.D., Yu, C.G., Mathis, J.P., Meyer, T.E., Shi, X., Siqueira, H.A. & Siegfried, B.D. (2005) Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 33-40.
- Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M.D., Tato, A. & Martinez, 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.

- Furlong, M.J., Wright, D.J. & Dosdall, L.M. (2013) Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 517-541.
- Gahan, L.J., Gould, F. & Heckel, D.G. (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293, 857-860.
- Gahan, L.J., Pauchet, Y., Vogel, H. & Heckel, D.G. (2010) An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet.* 6, e1001248.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W. & English, L. (2001) Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 1101-1109.
- Garczynski, S.F. & Adang, M.J. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Insect Biochem Mol Biol* 25, 409-415.
- Garner, K.J., Hiremath, S., Lehtoma, K. & Valaitis, A.P. (1999) Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 527-535.
- Gassmann, A.J., Carriere, Y. & Tabashnik, B.E. (2009) Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 147-163.
- Ge, A.Z., Shivarova, N.I. & Dean, D.H. (1989) Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 4037-4041.
- Georghiou, G.P. & Lagunes-Tejeda, A. (1991) *The Occurrence of Resistance to Pesticides in Arthropods*: FAO.
- Gill, M. & Ellar, D.J. (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. & 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.
- Glare, T.R. & O'Callaghan, M. (2000) *Bacillus Thuringiensis: Biology, Ecology and Safety* Chichester, U.K: John Wiley and Sons Ltd.

- Goffeau, A.B. (2004) ABC transporters. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. eds. W.J. Lennarz & D. Lane, pp. 1-5. :Academic Press.
- Goldberg, L.H. & Margalit, J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* 37, 355-358.
- Goldsmith, M.R. & Wilkins, A.S. (1995) *Molecular Model Systems in the Lepidoptera*: Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Goldsmith, M.R., Shimada, T. & Abe, H. (2005) The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 71-100.
- Gomez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A. & Soberon, 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.
- Gonzalez, J.M., Jr, Dulmage, H.T. & Carlton, B.C. (1981) Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 5, 352-365.
- Gonzalez-Cabrera, J., Herrero, S. & Ferre, J. (2001a) High genetic variability for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in a single population of diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5043-5048.
- Gonzalez-Cabrera, J., Herrero, S., Sayyed, A.H., Escriche, B., Liu, Y.B., Meyer, S.K., Wright, D.J., Tabashnik, B.E. & Ferre, J. (2001b) Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4610-4613.
- Gonzalez-Cabrera, J., Escriche, B., Tabashnik, B.E. & Ferre, J. (2003) Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 929-935.
- Gould, F., Anderson, A., Reynolds, A., Bumgarner, L. & Moar, W.J. (1995) Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 88, 1545-1559.
- Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D.G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R. & Laster, M. (1997) Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3519-3523.

- Gould, F. (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 701-726.
- Granados, R.R., Fu, Y., Corsaro, B. & Hughes, P.R. (2001) Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Toxicity to Lepidopterous Species with the Enhancin from *Trichoplusia ni* Granulovirus. *Biological Control* 20, 153-159.
- Granero, F., Ballester, V. & Ferre, J. (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.
- Granum, P.E. & Lund, T. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 223-228.
- Griffitts, J.S., Whitacre, J.L., Stevens, D.E. & Aroian, R.V. (2001) Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* 293, 860-864.
- Griffitts, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S., Dell, A., Adang, M.J. & Aroian, R.V. (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* 307, 922-925.
- Gringorten, J.L. (2001) Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. In: *Biochemical Sites of Insecticide Action and resistance*. ed. I. Ishaaya, pp. 167-207.: Springer Berlin Heidelberg.
- Grishin, N.V. (1995) Estimation of the number of amino acid substitutions per site when the substitution rate varies among sites. *J. Mol. Evol.* 41, 675-679.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. & Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447-464.
- Groeters, F.R., Tabashnik, B.E., Finson, N. & Johnson, M.W. (1994) Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth. *Evolution* 48, 197-201.
- Gunning, R.V., Dang, H.T., Kemp, F.C., Nicholson, I.C. & Moores, G.D. (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2558-2563.

- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D. & Rao, Z. (2009) Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168, 259-266.
- Guo, Z., Kang, S., Zhu, X., Wu, Q., Wang, S., Xie, W. & Zhang, Y. (2015a) The midgut cadherin-like gene is not associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* (L.) In press
- Guo Z, Kang S, Zhu X, Xia J, Wu Q, Wang S, Xie W & Zhang Y. (2015b) Down-regulation of a novel ABC transporter gene (*Pxwhite*) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* In press, 1-10
- Gupta, B.L., Dow, J.A., Hall, T.A. & Harvey, W.R. (1985) Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic K<sup>+</sup>-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, *in vitro*. *J. Cell. Sci.* 74, 137-152.
- Haider, M.Z., Knowles, B.H. & 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.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hara, H., Atsumi, S., Yaoi, K., Nakanishi, K., Higurashi, S., Miura, N., Tabunoki, H. & Sato, R. (2003) A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. *FEBS Lett.* 538, 29-34.
- Heckel, D.G., Gahan, L.C., Gould, F. & Anderson, A. (1997) Identification of a linkage group with a major effect on resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 90, 75-86.
- Heckel, D.G., Gahan, L.J., Liu, Y.B. & Tabashnik, B.E. (1999) Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8373-8377.
- Helgason, E., Caugant, D.A., Olsen, I. & Kolsto, A.B. (2000) Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1615-1622.

- Hernandez, C.S., Ferre, J. & Larget-Thiery, I. (2001) Update on the detection of beta-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis. *J. Appl. Microbiol.* 90, 643-647.
- Hernandez, C.S., Rodrigo, A. & Ferre, J. (2004) Lyophilization of lepidopteran midguts: a preserving method for *Bacillus thuringiensis* toxin binding studies. *J. Invertebr. Pathol.* 85, 182-187.
- Hernandez-Martinez, P., Ferre, J. & Escriche, B. (2009) Broad-spectrum cross-resistance in *Spodoptera exigua* from selection with a marginally toxic Cry protein. *Pest Manag. Sci.* 65, 645-650.
- Herrero, S., Ferre, J. & Escriche, B. (2001a) Mannose phosphate isomerase isoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in Lepidopteran species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 979-981.
- Herrero, S., Oppert, B. & Ferre, J. (2001b) Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1085-1089.
- Herrero, S., Gonzalez-Cabrera, J., Ferre, J., Bakker, P.L. & de Maagd, R.A. (2004) Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem. J.* 384, 507-513.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P.L., Moar, W.J. & de Maagd, R.A. (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6, 96.
- Higuchi, M., Haginoya, K., Yamazaki, T., Miyamoto, K., Katagiri, T., Tomimoto, K., Shitomi, Y., Hayakawa, T., Sato, R. & Hori, H. (2007) Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins to brush border membrane vesicles of midgut from Cry1Ac susceptible and resistant *Plutella xylostella*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 147, 716-724.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S. & 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. U. S. A.* 85, 7844-7848.
- Hofte, H. & Whiteley, H.R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.

- Hossain, D.M., Shitomi, Y., Moriyama, K., Higuchi, M., Hayakawa, T., Mitsui, T., Sato, R. & Hori, H. (2004) Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4604-4612.
- Hua, G., Tsukamoto, K. & Ikezawa, H. (1998a) Cloning and sequence analysis of the aminopeptidase N isozyme (APN2) from *Bombyx mori* midgut. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121, 213-222.
- Hua, G., Tsukamoto, K., Rasilo, M.L. & Ikezawa, H. (1998b) Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin. *Gene* 214, 177-185.
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L. & Adang, M.J. (2004) Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279, 28051-28056.
- Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M.A. & Adang, M.J. (2008) *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* 47, 5101-5110.
- Hua, G., Zhang, R., Bayyareddy, K. & Adang, M.J. (2009) *Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* jegathesan Cry11Ba toxin. *Biochemistry* 48, 9785-9793.
- Hua, G., Zhang, Q., Zhang, R., Abdullah, A. M., Linser, P. J. & Adang, M. J. (2013)  
AgCad2 cadherin in *Anopheles gambiae* larvae is a putative receptor of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 153-161.
- Hua, G., Park, Y. & Adang, M. J. (2014) Cadherin AdCad1 in *Alphitobius diaperinus* larvae is a receptor of Cry3Bb toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 11-17.
- 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 (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 90, 1137-1143.
- Huang, F., Higgins, R.A. & Buschman, L.L. (1999) Heredability and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bull. Entomol. Res.*, 89, 449-454.



- Huang, F., Andow, D.A. & Buschman, L.L. (2011) Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomol. Exp. Appl.* 140, 1-16.
- Huffman, D.L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, F.G. & Aroian, R.V. (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10995-11000.
- Hughes, A.L. (2014) Evolutionary diversification of aminopeptidase N in Lepidoptera by conserved clade-specific amino acid residues. *Mol. Phylogenet. Evol.* 76, 127-133.
- Hussain, S.R., Aronson, A.I. & Dean, D.H. (1996) Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 8-14.
- Ibarra, J.E., del Rincon, M.C., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C.M., Lanz, H., Rodriguez, M.H., Sanchez, J., Pena, G. & Bravo, A. (2003) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5269-5274.
- Ibiza-Palacios, M.S., Ferre, J., Higurashi, S., Miyamoto, K., Sato, R. & Escriche, B. (2008) Selective inhibition of binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to cadherin-like and aminopeptidase proteins in brush-border membranes and dissociated epithelial cells from *Bombyx mori*. *Biochem. J.* 409, 215-221.
- Ibrahim, M.A., Griko, N., Junker, M. & Bulla, L.A. (2010) *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioeng. Bugs* 1, 31-50.
- Ihara, H., Kuroda, E., Wadano, A. & Himeno, M. (1993) Specific toxicity of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 200-204.
- Ihara, H. & Himeno, M. (2008) Study of the irreversible binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 177-183.
- Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. & Meister, A. (1995) Expression of an active glycosylated human gamma-glutamyl transpeptidase mutant that lacks a membrane anchor domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 126-130.

Iqbal, M. & Wright, D.J. (1997) Evaluation of resistance, cross-resistance and synergism of abamectin and teflubenzuron in a multi-resistant field population of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bulletin of Entomological Research* 87, 481-486.

Iriarte, J. & Caballero, P. (2001) Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. In: *Bioinsecticidas: Fundamentos Y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en El Control Integrado De plagas*. eds. P. Caballero & J. Ferre:Phytoma.

Ishiwata, S. (1901) On a new type of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sansi Kaiho* 114, 1-5.

James, C. (2012) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012* Ithaca, NY: ISAAA.

James, C. (2013) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013* Ithaca, NY: ISAAA.

Janmaat, A.F. & Myers, J. (2003) Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. Biol. Sci.* 270, 2263-2270.

Jenkins, J.L., Lee, M.K., Sangadala, S., Adang, M.J. & 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.

Jenkins, J.L., Lee, M.K., Valaitis, A.P., Curtiss, A. & Dean, D.H. (2000) Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 14423-14431.

Jenkins, J.L. & 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.

Johnson, D.E., Oppert, B. & McGaughey, W.H. (1998) Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the indianmeal moth. *Curr. Microbiol.* 36, 278-282.

Jouzani, G.S., Abad, A.P., Seifinejad, A., Marzban, R., Kariman, K. & Maleki, B. (2008) Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 83-94.

Jurat-Fuentes, J.L. & 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.

Jurat-Fuentes, J.L., Gould, F.L. & Adang, M.J. (2002) Altered Glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5711-5717.

Jurat-Fuentes, J.L. & Adang, M.J. (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 271, 3127-3135.

Jurat-Fuentes, J.L. & Adang, M.J. (2006) The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. *Biochemistry* 45, 9688-9695.

Keeton, T.P. & 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.

Keim, P., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S.E., Richmond, K., Adair, D.M., Hugh-Jones, M., Kuske, C.R. & Jackson, P. (1997) Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J. Bacteriol.* 179, 818-824.

Kim, T.H., Seo, G.M., Jung, K.H., Kim, S.J., Kim, J.C., Oh, K.G., Koo, B.S. & Chai, Y.G. (2007) Generation of a specific marker to discriminate *Bacillus anthracis* from other bacteria of the *Bacillus cereus* group. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 806-811.

Kim, W., Kim, J.Y., Cho, S.L., Nam, S.W., Shin, J.W., Kim, Y.S. & Shin, H.S. (2008) Glycosyltransferase: a specific marker for the discrimination of *Bacillus anthracis* from the *Bacillus cereus* group. *J. Med. Microbiol.* 57, 279-286.

Kim, Y.S., Kanda, K., Kato, F. & Murata, A. (1998) Effect of the carboxyl-terminal portion of Cry1Ab in *Bacillus thuringiensis* on toxicity against the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Entomol. Zool.* 33, 473-477.

Knight, P.J., Crickmore, N. & Ellar, D.J. (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11, 429-436.

Knight, P.J., Knowles, B.H. & Ellar, D.J. (1995) Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Biol. Chem.* 270, 17765-17770.

Knight, P.J., Carroll, J. & Ellar, D.J. (2004) Analysis of glycan structures on the 120 kDa aminopeptidase N of *Manduca sexta* and their interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 101-112.

Knowles, B.H. & Ellar, D.J. (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 924, 507-518.

Knowles, B.H., Knight, P.J. & 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. Biol. Sci.* 245, 31-35.

Knowles, B.H. & Dow, J.A. (1993) The crystal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioessays* 15, 469-476.

Knowles, B.H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. *Advan. Insect Physiol.* 24, 275-308.

Kolsto, A.B., Tourasse, N.J. & Okstad, O.A. (2009) What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 451-476.

Koni, P.A. & Ellar, D.J. (1994) Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins. *Microbiology* 140 ( Pt 8), 1869-1880.

Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A. & Schnetter, W. (1983) *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*; ein neuer, gegen Larven von Coleopteren wirksamer Pathotype. *Z Ang. Ent.* 96, 500-508.

Kronstad, J.W., Schnepf, H.E. & Whiteley, H.R. (1983) Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.* 154, 419-428.

Kuo, W.S. & Chak, K.F. (1996) Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1369-1377.

Kurin, R. (2002) The Silk Road: Connecting Cultures, Creating Trust. *Smithsonian Center for Folklife and Cultural Heritage* 21, 1-11.

- Laustsen, P.G., Vang, S. & Kristensen, T. (2001) Mutational analysis of the active site of human insulin-regulated aminopeptidase. *Eur. J. Biochem.* 268, 98-104.
- Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P. & Thiery, I. (1999) Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 660-672.
- Lee, K.Y., Kang, E.Y., Park, S., Ahn, S.K., Yoo, K.H., Kim, J.Y. & Lee, H.H. (2006a) Mass spectrometric sequencing of endotoxin proteins of *Bacillus thuringiensis* ssp. *konkukian* extracted from polyacrylamide gels. *Proteomics* 6, 1512-1517.
- Lee, M.K., Milne, R.E., Ge, A.Z. & Dean, D.H. (1992) Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *J. Biol. Chem.* 267, 3115-3121.
- Lee, M.K., Rajamohan, F., Gould, F. & Dean, D.H. (1995a) 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., Young, B.A. & Dean, D.H. (1995b) Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 306-312.
- Lee, M.K., Jenkins, J.L., You, T.H., Curtiss, A., Son, J.J., Adang, M.J. & Dean, D.H. (2001) Mutations at the arginine residues in alpha8 loop of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *FEBS Lett.* 497, 108-112.
- Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. & 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., Miles, P. & Chen, J.S. (2006b) Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 1043-1047.
- Letowski, J., Bravo, A., Brousseau, R. & Masson, L. (2005) Assessment of cry1 gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains by use of DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5391-5398.

- Li, H., Oppert, B., Higgins, R.A., Huang, F., Zhu, K.Y. & Buschman, L.L. (2004) Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 753-762.
- Li, J. (1992) Bacterial toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 545-556.
- Li, J., Koni, P.A. & 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. & Ellar, D.J. (1991) Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815-821.
- Li, X., Schuler, M.A. & Berenbaum, M.R. (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231-253.
- Liang, Y., Patel, S.S. & 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.
- Lin, C.Q., Mi, Y.D., Yao, Q., Wu, D.X. & Wei, Z.J. (1997) Discovery of the major dominant gene of fluoride resistance in *Bombyx mori* L. . *Acta Seric. Sin.* 23, 237-239.
- Liu, Y. & Tabashnik, B.E. (1997) Inheritance of Resistance to the *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1C in the Diamondback Moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2218-2223.
- Liu, Y.B., Tabashnik, B.E. & Puzsai-Carey, M. (1996) Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 89, 798-804.
- Liu, Y.B. & Tabashnik, B.E. (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., Tabashnik, B.E., Moar, W.J. & 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., 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., Masson, L., Escriche, B. & Ferre, J. (2000) Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1C to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 93, 1-6.
- Loeb, M.J., Martin, P.A., Hakim, R.S., Goto, S. & Takeda, M. (2001) Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol.* 47, 599-606.
- Lopez-Diaz, J.A., Canton, P.E., Gill, S.S., Soberon, M. & Bravo, A. (2013) Oligomerization is a key step in Cyt1Aa membrane insertion and toxicity but not necessary to synergize Cry11Aa toxicity in *Aedes aegypti* larvae. *Environ. Microbiol.*
- Loseva, O., Ibrahim, M., Candas, M., Koller, C.N., Bauer, L.S. & Bulla, L.A., Jr. (2002) Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 567-577.
- Lu, H., Rajamohan, F. & Dean, D.H. (1994) Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* 176, 5554-5559.
- Luo, K., Lu, Y.L. & Adang, M.J. (1996) A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 26, 783-791.
- Luo, K., Tabashnik, B.E. & Adang, M.J. (1997) Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin to Aminopeptidase in Susceptible and Resistant Diamondback Moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1024-1027.
- Luttrell, R.G., Wan, L. & 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.
- Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R. & Schmidt, O. (2005) Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 729-739.

- Mackedonski, V.V., Nikolaev, N., Sebesta, K. & Hadjiolov, A.A. (1972) Inhibition of ribonucleic acid biosynthesis in mice liver by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 272, 56-66.
- Mahon, R.J., Downes, S.J. & James, B. (2012) Vip3A resistance alleles exist at high levels in Australian targets before release of cotton expressing this toxin. *PLoS One* 7, e39192.
- Martins, E.S., Monnerat, R.G., Queiroz, P.R., Dumas, V.F., Braz, S.V., de Souza Aguiar, R.W., Gomes, A.C., Sanchez, J., Bravo, A. & Ribeiro, B.M. (2010) Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 138-145.
- Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Aneliunas, V. & Brousseau, R. (1994) Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* 14, 851-860.
- Masson, L., Lu, Y.J., Mazza, A., Brousseau, R. & Adang, M.J. (1995) The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* 270, 20309-20315.
- Masson, L., Erlandson, M., Pusztai-Carey, M., Brousseau, R., Juarez-Perez, V. & Frutos, R. (1998) A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4782-4788.
- Masson, L., Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Brousseau, R. & 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.
- Massova, I., Kotra, L.P. & Mobashery, S. (1998) Structural insight into the binding motifs for the calcium ion and the non-catalytic zinc in matrix metalloproteases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 853-858.
- Matsui, M., Fowler, J.H. & Walling, L.L. (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* 387, 1535-1544.
- McGaughey, W.H. (1985) Insect Resistance to the Biological Insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229, 193-195.
- McGaughey, W.H. & Johnson, D.E. (1987) Toxicity of different serotypes and toxins of *Bacillus thuringiensis* to resistant and susceptible Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 80, 1122-1126.



- McGaughey, W.H. & Beeman, R.W. (1988) Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 81, 28-33.
- McNall, R.J. & Adang, M.J. (2003) Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 999-1010.
- Milne, R., Wright, T., Kaplan, H. & Dean, D. (1998) Spruce budworm elastase precipitates *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by specifically recognizing the C-terminal region. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 1013-1023.
- Milne, R.E., Pang, A.S. & Kaplan, H. (1995) A protein complex from *Choristoneura fumiferana* gut-juice involved in the precipitation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 1101-1114.
- Mita, K., Morimyo, M., Okano, K., Koike, Y., Nohata, J., Kawasaki, H., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Suzuki, M.G., Shimada, T., Goldsmith, M.R. & Maeda, S. (2003) The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14121-14126.
- Miyasono, M., Inagaki, S., Yamamoto, M., Ohba, K., Ishiguro, T., Takeda, R. & Hayashi, Y. (1994) Enhancement of  $\delta$ -endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr Pathol.* 64, 111-112.
- Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H. & Park, Y.S. (1999) Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* 86, 477-486.
- Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Van Faassen, H., Bosch, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K. & Adang, M.J. (1995) Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC Resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2086-2092.
- Mock, M. & Fouet, A. (2001) Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 647-671.
- Mohan, M. & Gujar, G.T. (2003) Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 82, 1-11.

Mora, M. (1990) Evaluación de alternativas de manejo de *Plutella xylostella* L. en el cultivo de repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) en Honduras. *Tesis En Ingeniería Agrícola*.

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. & Tabashnik, B.E. (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5004-5009.

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

Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Darszon, A., de Maagd, R.A., Bakker, P., Soberon, M. & Bravo, A. (2006) Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different cry toxins. *J. Membr. Biol.* 212, 61-68.

Munoz-Garay, C., Rodriguez-Almazan, C., Aguilar, J.N., Portugal, L., Gomez, I., Saab-Rincon, G., Soberon, M. & Bravo, A. (2009) Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7548-7550.

Munson, P.J. & Rodbard, D. (1980) Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* 107, 220-239.

Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasaki, K., Yoshimoto, A. & 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.

Nair, M.S., Liu, X.S. & Dean, D.H. (2008) Membrane insertion of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin: single mutation in domain II block partitioning of the toxin into the brush border membrane. *Biochemistry* 47, 5814-5822.

Nakanishi, K., Yaoi, K., Shimada, N., Kadotani, T. & Sato, R. (1999) *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin binds to a highly conserved region of aminopeptidase N in the host insect leading to its evolutionary success. *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 57-63.

Nakanishi, K., Yaoi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., Atsumi, S., Miura, N. & Sato, R. (2002) Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* -- their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Lett.* 519, 215-220.

- Ogoyi, D.O., Kadono-Okuda, K., Eguchi, R., Furuta, Y., Hara, W., Nguu, E.K. & Nagayasu, K. (2003) Linkage and mapping analysis of a non-susceptibility gene to densovirus (nsd-2) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 12, 117-124.
- Ohba, M., Mizuki, E. & Uemori, A. (2009) Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res.* 29, 427-433.
- Oliwa-Stasiak, K., Molnar, C.I., Arshak, K., Bartoszcze, M. & Adley, C.C. (2010) Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *J. Appl. Microbiol.* 108, 266-273.
- Oltean, D.I., Pullikuth, A.K., Lee, H.K. & Gill, S.S. (1999) Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor A from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4760-4766.
- Onstad, D.W. & Meinke, L.J. (2010) Modeling evolution of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) to transgenic corn with two insecticidal traits. *J. Econ. Entomol.* 103, 849-860.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Johnson, D. & McGaughey, W.H. (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272, 23473-23476.
- Oppert, B. (1999) Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 1-12.
- Pacheco, S., Gomez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodriguez-Almazan, C., Gill, S.S., Bravo, A. & Soberon, M. (2009) Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 32750-32757.
- Pandian, G.N., Ishikawa, T., Togashi, M., Shitomi, Y., Haginoya, K., Yamamoto, S., Nishiumi, T. & Hori, H. (2008) *Bombyx mori* midgut membrane protein P252, which binds to *Bacillus thuringiensis* Cry1A, is a chlorophyllide-binding protein, and the resulting complex has antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1324-1331.
- Papadopoulos, J.S. & Agarwala, R. (2007) COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23, 1073-1079.

Pardo-Lopez, L., Soberon, M. & Bravo, A. (2013) *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 3-22.

Park, Y., Abdullah, M.A., Taylor, M.D., Rahman, K. & Adang, M.J. (2009a) Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3086-3092.

Park, Y., Hua, G., Abdullah, M.A., Rahman, K. & Adang, M.J. (2009b) Cadherin fragments from *Anopheles gambiae* synergize *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba's toxicity against *Aedes aegypti* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7280-7282.

Park, Y., Gonzalez-Martinez, R.M., Navarro-Cerrillo, G., Chakroun, M., Kim, Y., Ziarolo, P., Blanca, J., Canizares, J., Ferre, J. & Herrero, S. (2014) ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biol.* 12, 46-7007-12-46.

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

Peng, D., Xu, X., Ruan, L., Yu, Z. & Sun, M. (2010a) Enhancing Cry1Ac toxicity by expression of the *Helicoverpa armigera* cadherin fragment in *Bacillus thuringiensis*. *Res. Microbiol.* 161, 383-389.

Peng, D., Xu, X., Ye, W., Yu, Z. & Sun, M. (2010b) *Helicoverpa armigera* cadherin fragment enhances Cry1Ac insecticidal activity by facilitating toxin-oligomer formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1033-1040.

Perez, C., Fernandez, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberon, M. & Bravo, A. (2005) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18303-18308.

Perez, C.J. & Shelton, A.M. (1997) Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. *J. Econ. Entomol.* 90, 87-93.

Peyronnet, O., Vachon, V., Brousseau, R., Baines, D., Schwartz, J.L. & Laprade, R. (1997) Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1679-1684.

Pigott, C.R. & Ellar, D.J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 255-281.

Prachumwat, A., DeVincentis, L. & Palopoli, M.F. (2004) Intron size correlates positively with recombination rate in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 166, 1585-1590.

Promdonkoy, B. & Ellar, D.J. (2003) Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 374, 255-259.

Promdonkoy, B. & Ellar, D.J. (2005) Structure-function relationships of a membrane pore forming toxin revealed by reversion mutagenesis. *Mol. Membr. Biol.* 22, 327-337.

Pu, X., Yang, Y., Wu, S. & Wu, Y. (2010) Characterisation of abamectin resistance in a field-evolved multiresistant population of *Plutella xylostella*. *Pest Manag. Sci.* 66, 371-378.

Rahman, M.M., Roberts, H.L. & Schmidt, O. (2007) Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephesia kuehniella*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 125-132.

Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P. & Bhatnagar, R.K. (2002) Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 46849-46851.

Rajagopal, R., Agrawal, N., Selvapandiyan, A., Sivakumar, S., Ahmad, S. & Bhatnagar, R.K. (2003) Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Biochem. J.* 370, 971-978.

Rajamohan, F., Alcantara, E., Lee, M.K., Chen, X.J., Curtiss, A. & Dean, D.H. (1995) Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 177, 2276-2282.

Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J.A., Curtiss, A. & Dean, D.H. (1996a) Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14338-14343.

Rajamohan, F., Cotrill, J.A., Gould, F. & Dean, D.H. (1996b) Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 271, 2390-2396.

Rajamohan, F., Hussain, S.R., Cotrill, J.A., Gould, F. & Dean, D.H. (1996c) Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb delta-endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J. Biol. Chem.* 271, 25220-25226.

Ranasinghe, C. & Akhurst, R.J. (2002) Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detecting novel Bt toxins. *J. Invertebr. Pathol.* 79, 51-58.

Rausell, C., Garcia-Robles, I., Sanchez, J., Munoz-Garay, C., Martinez-Ramirez, A.C., Real, M.D. & Bravo, A. (2004a) Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 99-105.

Rausell, C., Munoz-Garay, C., Miranda-CassoLuengo, R., Gomez, I., Rudino-Pinera, E., Soberon, M. & Bravo, A. (2004b) Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* 43, 166-174.

Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1995) Evolutionary families of metalloproteases. *Methods Enzymol.* 248, 183-228.

Read, T.D., Peterson, S.N., Tourasse, N., Baillie, L.W., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Tettelin, H., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Holtzapple, E.K., Okstad, O.A., Helgason, E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J.F., Beanan, M.J., Dodson, R.J., Brinkac, L.M., Gwinn, M., DeBoy, R.T., Madpu, R., Daugherty, S.C., Durkin, A.S., Haft, D.H., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Pop, M., Khouri, H.M., Radune, D., Benton, J.L., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I.R., Weidman, J.F., Berry, K.J., Plaut, R.D., Wolf, A.M., Watkins, K.L., Nierman, W.C., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J.E., White, O., Salzberg, S.L., Thomason, B., Friedlander, A.M., Koehler, T.M., Hanna, P.C., Kolsto, A.B. & Fraser, C.M. (2003) The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 423, 81-86.

Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J. & Zilberstein, A. (1996) Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3581-3586.

- Reyes-Ramirez, A. & Ibarra, J.E. (2008) Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 125-129.
- Robertson, J.L. & Presisler, H.K. (1991) *Pesticide bioassays with Arthropods*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Rosario, C. & Cruz, C. (1986) Life cycle of Diamondback Moth *Plutella xylostella* (L.). (Lepidoptera: plutellidae) in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 70, 229-233.
- Roush, R.T. (1998) Two toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not?. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 353, 1777-1786.
- Russell, D.A., Uijtewaal, B., Dhawan, V., Grzywacz, D. & Kaliaperumal, R. (2011) Progress and challenges in the Bt brassica CIMBAA public/private partnership. In: *The Sixth International Workshop on Management of the Diamondback Moth and Other Crucifer Insect Pests*. eds. R. Srinivasan, A.M. Shelton & H.L. Collins, pp. 19-27. Nakhon Pathom, Thailand: AVRDC – The World Vegetable Center.
- Russell, R.M., Robertson, J.L. & Savin, N.E. (1977) POLO: a new computer program for probit analysis. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 23, 209-213.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Salamitou, S., Ramiise, F., Brehelin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., Hernandez, E. & Lereclus, D. (2000) The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* 146 ( Pt 11), 2825-2832.
- Saleh, S.M., Harris, R.F. & Allen, O.N. (1970) Fate of *Bacillus thuringiensis* in soil: effect of soil pH and organic amendment. *Can. J. Microbiol.* 16, 677-680.
- Sampson, M.N. & Gooday, G.W. (1998) Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* 144 ( Pt 8), 2189-2194.
- Sanchis, V., Chaufaux, J. & Pauron, D. (1994) A comparison and analysis of the toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombyx mori*. *FEBS Lett.* 353, 259-263.

- Sangadala, S., Walters, F.S., English, L.H. & 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.
- Sangadala, S., Azadi, P., Carlson, R. & Adang, M.J. (2001) Carbohydrate analyses of *Manduca sexta* aminopeptidase N, co-purifying neutral lipids and their functional interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 97-107.
- Sayed, A., Nekl, E.R., Siqueira, H.A., Wang, H.C., Ffrench-Constant, R.H., Bagley, M. & Siegfried, B.D. (2007) A novel cadherin-like gene from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), larval midgut tissue. *Insect Mol. Biol.* 16, 591-600.
- Sayyed, A.H., Haward, R., Herrero, S., Ferre, 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1509-1516.
- Sayyed, A.H., Gatsi, R., Kouskoura, T., Wright, D.J. & 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.
- Sayyed, A.H. & Wright, D.J. (2001) Cross-resistance and inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth (*Plutella xylostella* L) from lowland Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 57, 413-421.
- Sayyed, A.H., Schuler, T.H. & Wright, D.J. (2003) Inheritance of resistance to Bt canola in a field-derived population of *Plutella xylostella*. *Pest Manag. Sci.* 59, 1197-1202.
- Sayyed, A.H., Raymond, B., Ibiza-Palacios, M.S., Escriche, B. & Wright, D.J. (2004) Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7010-7017.
- Sayyed, A.H., Gatsi, R., Ibiza-Palacios, M.S., Escriche, B., Wright, D.J. & Crickmore, N. (2005) Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6863-6869.
- Sayyed, A.H., Moores, G., Crickmore, N. & Wright, D.J. (2008) Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth. *Pest Manag. Sci.* 64, 813-819.



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. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5857-5864.

Schwartz, J.L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Prefontaine, G., Brousseau, R. & Masson, L. (1997) Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* 410, 397-402.

Sebesta, K. & Horska, K. (1970) Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 209, 357-376.

Shao, Z., Cui, Y., Liu, X., Yi, H., Ji, J. & Yu, Z. (1998) Processing of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 73-81.

Shitomi, Y., Hayakawa, T., Hossain, D.M., Higuchi, M., Miyamoto, K., Nakanishi, K., Sato, R. & Hori, H. (2006) A novel 96-kDa aminopeptidase localized on epithelial cell membranes of *Bombyx mori* midgut, which binds to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biochem.* 139, 223-233.

Simpson, R.M. & 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.

Smedley, D.P. & Ellar, D.J. (1996) Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* 142 ( Pt 7), 1617-1624.

Smith, G.P. & 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.

Smith, R.A. & Couche, G.A. (1991) The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 311-315.

- Stewart, G.S., Johnstone, K., Hagelberg, E. & Ellar, D.J. (1981) Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *Biochem. J.* 198, 101-106.
- Stodola, T.J., Andow, D.A., Hyden, A.R., Hinton, J.L., Roark, J.J., Buschman, L.L., Porter, P. & Cronholm, G.B. (2006) Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in southern United States Corn Belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.*, 99, 502-507.
- Sturtevant, A.H. (1915) No crossing over in the female of the silkworm moth. *Am Nat* 49, 42-44.
- Sun, Y., Fu, Z., Ding, X. & Xia, L. (2008) Evaluating the insecticidal genes and their expressed products in *Bacillus thuringiensis* strains by combining PCR with mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6811-6813.
- Tabashnik, B.E. (1987) Plant secondary compounds as oviposition deterrents for cabbage butterfly, *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *J. Chem. Ecol.* 13, 309-316.
- Tabashnik, B.E. (1990) Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 83, 1170-1176.
- Tabashnik, B.E. (1991) Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. *J. Econ. Entomol.* 84, 703-712.
- Tabashnik, B.E., Schwartz, J.M., Finson, N. & Johnson, M.W. (1992) Inheritance of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 85, 1046-1055.
- Tabashnik, B.E. (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 47-79.
- Tabashnik, B.E., Finson, N., Groeters, F.R., Moar, W.J., Johnson, M.W., Luo, K. & Adang, M.J. (1994a) Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4120-4124.
- Tabashnik, B.E., Finson, N., Johnson, M.W. & Heckel, D.G. (1994b) Cross-Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIF in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4627-4629.
- Tabashnik, B.E., Finson, N., Johnson, M.W. & Heckel, D.G. (1995) Prolonged selection affects stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 88, 219-224.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1640-1644.

Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Mensua, J.L. & Ferre, J. (1997b) Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12780-12785.

Tabashnik, B.E., Carriere, 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. *J. Econ. Entomol.* 96, 1031-1038.

Tabashnik, B.E. (2008) Delaying insect resistance to transgenic crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19029-19030.

Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B. & Carriere, Y. (2009) Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *J. Econ. Entomol.* 102, 2011-2025.

Tabashnik, B.E., Sisterson, M.S., Ellsworth, P.C., Dennehy, T.J., Antilla, L., Liesner, L., Whitlow, M., Staten, R.T., Fabrick, J.A., Unnithan, G.C., Yelich, A.J., Eilers-Kirk, C., Harpold, V.S., Li, X. & Carriere, Y. (2010) Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. *Nat. Biotechnol.* 28, 1304-1307.

Tabashnik, B.E., Huang, F., Ghimire, M.N., Leonard, B.R., Siegfried, B.D., Rangasamy, M., Yang, Y., Wu, Y., Gahan, L.J., Heckel, D.G., Bravo, A. & Soberon, M. (2011) Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nat. Biotechnol.* 29, 1128-1131.

Tabashnik, B.E., Brevault, T. & Carriere, Y. (2013) Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat. Biotechnol.* 31, 510-521.

Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J.C. & Couble, P. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18, 81-84.

Tanaka, S., Miyamoto, K., Noda, H., Jurat-Fuentes, J.L., Yoshizawa, Y., Endo, H. & Sato, R. (2013) The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS J.* 280, 1782-1794.

- Tang, J.D., Shelton, A.M., Van Rie, J., De Roeck, S., Moar, W.J., Roush, R.T. & Peferoen, M. (1996) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Spore and Crystal Protein to Resistant Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 564-569.
- Tang, J.D., Gilboa, S., Roush, R.T. & Shelton, A.M. (1997) Inheritance, stability and lack of fitness costs of field-selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth from Florida. *J. Econ. Entomol.* 90, 732-741.
- Terra, W.R. & Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 109, 1-62.
- Thomas, W.E. & Ellar, D.J. (1983a) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. *FEBS Lett.* 154, 362-368.
- Thomas, W.E. & Ellar, D.J. (1983b) *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Sci.* 60, 181-197.
- Tiewsi, K. & Wang, P. (2011) Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14037-14042.
- Tomita, M., Munetsuna, H., Sato, T., Adachi, T., Hino, R., Hayashi, M., Shimizu, K., Nakamura, N., Tamura, T. & Yoshizato, K. (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.* 21, 52-56.
- Traut, W. (1977) A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera). *Genetica* 47, 135-142.
- Tsuda, Y., Nakatani, F., Hashimoto, K., Ikawa, S., Matsuura, C., Fukada, T., Sugimoto, K. & Himeno, M. (2003) Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm). *Biochem. J.* 369, 697-703.
- Vadlamudi, R.K., Ji, T.H. & 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.

- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H. & Bulla, L.A., Jr. (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494.
- Valaitis, A.P., Lee, M.K., Rajamohan, F. & 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.
- Valaitis, A.P., Jenkins, J.L., Lee, M.K., Dean, D.H. & Garner, K.J. (2001) Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins with high affinity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 46, 186-200.
- Valaitis, A.P. (2008) *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 611-618.
- Vallee, B.L. & Auld, D.S. (1995) Zinc metallochemistry in biochemistry. *EXS* 73, 259-277.
- van Frankenhuyzen, K. (1993) The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus Thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. eds. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey & S. Higgs, pp. 1-35. Chichester, UK:John Wiley & Sons.
- van Frankenhuyzen, K. (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 1-16.
- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. & Van Mellaert, H. (1989) Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186, 239-247.
- Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.D. & Van Mellaert, H. (1990) Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247, 72-74.
- Vankova, J. (1978) The heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Folia Microbiol. (Praha)* 23, 162-174.
- Vidal-Quist, J.C., Castanera, P. & Gonzalez-Cabrera, J. (2009) Simple and rapid method for PCR characterization of large *Bacillus thuringiensis* strain collections. *Curr. Microbiol.* 58, 421-425.

- Wagner, W., Mohrlen, F. & Schnetter, W. (2002) Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 803-814.
- Wang, P. & Granados, R.R. (2001) Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 110-118.
- Wang, P., Zhao, J.Z., Rodrigo-Simon, A., Kain, W., Janmaat, A.F., Shelton, A.M., Ferre, J. & Myers, J. (2007) Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1199-1207.
- Warren, G.W., Koziel, M.G. & Mullins, M.A. (1996) Novel pesticidal proteins and strains.
- Warren, G.W. (1997) Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. Anonymous, pp. 109-121. London: Taylor and Francis Ltd.
- Wei, J.Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.C. & Aroian, R.V. (2003) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2760-2765.
- Wheelock, M.J. & Johnson, K.R. (2003) Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 207-235.
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P. & 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. U. S. A.* 94, 10536-10540.
- Wirth, M.C., Walton, W.E. & Federici, B.A. (2010) Inheritance patterns, dominance, stability, and allelism of insecticide resistance and cross-resistance in two colonies of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) selected with Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp, *israelensis*. *J. Med. Entomol.* 47, 814-822.
- 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. & Ferre, 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. & 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. & Dean, D.H. (1996) Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA delta-endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255, 628-640.
- Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., Zhao, P., Zha, X., Cheng, T., Chai, C., Pan, G., Xu, J., Liu, C., Lin, Y., Qian, J., Hou, Y., Wu, Z., Li, G., Pan, M., Li, C., Shen, Y., Lan, X., Yuan, L., Li, T., Xu, H., Yang, G., Wan, Y., Zhu, Y., Yu, M., Shen, W., Wu, D., Xiang, Z., Yu, J., Wang, J., Li, R., Shi, J., Li, H., Li, G., Su, J., Wang, X., Li, G., Zhang, Z., Wu, Q., Li, J., Zhang, Q., Wei, N., Xu, J., Sun, H., Dong, L., Liu, D., Zhao, S., Zhao, X., Meng, Q., Lan, F., Huang, X., Li, Y., Fang, L., Li, C., Li, D., Sun, Y., Zhang, Z., Yang, Z., Huang, Y., Xi, Y., Qi, Q., He, D., Huang, H., Zhang, X., Wang, Z., Li, W., Cao, Y., Yu, Y., Yu, H., Li, J., Ye, J., Chen, H., Zhou, Y., Liu, B., Wang, J., Ye, J., Ji, H., Li, S., Ni, P., Zhang, J., Zhang, Y., Zheng, H., Mao, B., Wang, W., Ye, C., Li, S., Wang, J., Wong, G.K., Yang, H. & Biology Analysis Group. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306, 1937-1940.
- Xiang, Z.H. (1995) Genetics and Breeding of the Silkworm. *Chinese Agriculture Press*, 273-289.
- Xiao, Y., Zhang, T., Liu, C., Heckel, D.G., Li, X., Tabashnik, B.E. & Wu, K. (2014) Mis-splicing of the ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. *Sci. Rep.* 4, 6184.
- Xu, X., Yu, L. & Wu, Y. (2005) Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 948-954.
- Yamamoto, T. & Dean, D.H. (2000) Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. eds. J.F. Charles, A. Delecluse & C. Nielsen-LeRoux, pp. 81-100. The Netherlands:Kluwer Academic Publishers.
- Yang, Y., Chen, H., Wu, Y., Yang, Y. & Wu, S. (2007) Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6939-6944.

- Yang, Y.H., Yang, Y.J., Gao, W.Y., Guo, J.J., Wu, Y.H. & Wu, Y.D. (2009) Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible *Helicoverpa armigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Bull. Entomol. Res.* 99, 175-181.
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H. & Sato, R. (1997) Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* 246, 652-657.
- Yaoi, K., Nakanishi, K., Kadotani, T., Imamura, M., Koizumi, N., Iwahana, H. & Sato, R. (1999) *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin-binding region of *Bombyx mori* aminopeptidase N. *FEBS Lett.* 463, 221-224.
- Yu, C.G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G. & Estruch, J.J. (1997) The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 532-536.
- Zavala, L.E., Pardo-Lopez, L., Canton, P.E., Gomez, I., Soberon, M. & Bravo, A. (2011) Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane. *J. Biol. Chem.* 286, 19109-19117.
- Zhang, H., Li, H.C. & Miao, X.X. (2013) Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect Sci.* 20, 15-30.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Rose-Young, L. & Bulla, L.A., Jr. (2005) Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* 12, 1407-1416.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R. & Bulla, L.A., Jr. (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9897-9902.
- Zhang, X., Griko, N.B., Corona, S.K. & Bulla, L.A., Jr. (2008) Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 149, 581-588.
- Zhang, X., Tiewisiri, K., Kain, W., Huang, L. & Wang, P. (2012) Resistance of *Trichoplusia ni* to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac is independent of alteration of the cadherin-like receptor for Cry toxins. *PLoS One* 7, e35991.



Zhao, J., Jin, L., Yang, Y. & Wu, Y. (2010) Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 113-118.

Zhao, J.Z., Collins, H.L., Tang, J.D., Cao, J., Earle, E.D., Roush, R.T., Herrero, S., Escriche, B., Ferre, J. & 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.

Zhu, Y.C., Kramer, K.J., Oppert, B. & Dowdy, A.K. (2000) cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 215-224.

Zhuang, M., Oltean, D.I., Gomez, I., Pullikuth, A.K., Soberon, M., Bravo, A. & Gill, S.S. (2002) *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277, 13863-13872.

