



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO DE ACCIÓN  
DE LA TOXINA Cry1AbMod, ACTIVA CONTRA  
INSECTOS RESISTENTES, Y SU COMPARACIÓN  
CON LA TOXINA CONVENCIONAL Cry1Ab DE  
*Bacillus thuringiensis*.**

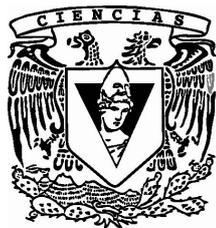
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**GERARDO DEL TORO DE LEÓN**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. María Alejandra Bravo de la Parra**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# JURADO ASIGNADO

---

**Presidente:** Dra. Martha Graciela Rocha Múnive

**Secretario:** Dra. María Alejandra Bravo de la Parra

**Vocal:** Dra. Helena Porta Ducoing

**Suplente:** Dr. Mario Soberón Chávez

**Suplente:** Dra. Isabel Gómez Gómez

A los pilares de mi vida:

mi Padre,

mi Madre,

mi hermano,

quienes en todo momento me apoyaron.

A la UNAM.



# AGRADECIMIENTOS

---

A todos aquellos que formaron parte de esta historia y que seguirán dentro de ella.

A mis entrañables amigos del H. Cuadro de la Facultad de Ciencias, testigos de esta larga pero fugaz travesía.

A quien su amistad extraño y aguardo.

Al comedor estudiantil de mi facultad, semillero de tantos recuerdos y amigos.

A mis compañeros de sueños e ilusiones.

A quien sigue gobernando mis emociones.

A nuestra inolvidable Facultad de Ciencias.

# AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Alejandra Bravo del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por brindarme esta oportunidad y confiar en mí.

Al Dr. Concho Rodríguez y Don Lauro de quienes aprendí durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Jorge Ibarra y todo su equipo quienes me apoyaron durante mi estancia en el CINVESTAV de Irapuato.

Al Dr. Mario Soberón, a la Dra. Isabel Gómez, Dra. Helena Porta, Dra. Adriana Otero, Dra. Martha Rocha quienes amablemente leyeron y comentaron mi tesis.

Gracias a todos por sus enseñanzas, guías y ejemplos a seguir.

# INDICE

---

RESUMEN	III
ABSTRACT	V
ABREVIATURAS	VI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Toxinas Cry	3
1.1.1. Estructura y clasificación de las toxinas Cry	4
1.1.2. Empleo de las toxinas Cry como insecticidas	8
1.1.3. Modo de acción de las toxinas Cry	10
1.1.3.1. Modelo de Formación de Poro (MFP)	11
1.1.3.2. Modelo de Transducción de Señal (MTS)	12
1.1.4. Importancia de los receptores en el modo de acción de las toxinas Cry	14
1.1.4.1. Receptor caderina en Lepidópteros	14
1.1.4.2. Receptores anclados a membrana por glicosilfosfatidilinosito (GPI)	16
1.1.5. Toxinas Cry activas contra el Orden Coleóptera	18
1.2. Evolución de resistencia a cultivos genéticamente modificados	19
1.2.1. Mecanismos de resistencia a cultivos genéticamente modificados.	19
1.2.1.1. Cambios en la activación proteolítica	19
1.2.1.2. Cambios en la unión a receptores	20
1.2.1.3. Respuesta inmune	20
1.2.2. Factores que influyen en el desarrollo de resistencia	21
1.2.2.1. Factores Genéticos	21
1.2.2.2. Factores Ecológicos y Biológicos	22
1.2.2.3. Factores del Cultivo Bt	22
1.3. Bioensayo	23
1.4. Especies de estudio	23
1.4.1. <i>Tribolium castaneum</i> Herbst (COLEOPTERA: TENEBRIONIDA)	23
1.4.2. <i>Leptinotarsa texana</i> Schaeffer (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)	24
1.4.3. <i>Galleria melonella</i> L. (Lepidóptera, Pyralidae)	25
1.4.4. <i>Spodoptera exigua</i> Hubner y <i>Spodoptera frugiperda</i> Smith (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	25

<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>27</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>32</b>
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<b>7. DISUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

---

Las toxinas Cry son producidas por la bacteria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis*. Éstas proteínas con propiedades tóxicas para algunos insectos plaga son altamente específicas y se conocen como toxinas Cry, ya que se acumulan en forma de cristales. Los bioinsecticidas con base en las proteínas producidas por *B. thuringiensis* son de los más utilizados para el control de plagas en todo el mundo desde los años 50's. Su uso se ha incrementado con el cultivo de plantas genéticamente modificadas, capaces de producir en sus tejidos estas toxinas (plantas Bt). El empleo de esta tecnología tiene muchos beneficios ya que las proteínas Cry son altamente específicas, biodegradables, inocuas para los humanos y efectivas contra muchas de las plagas más importantes en la agricultura. Sin embargo, el desarrollo de resistencia por parte de los insectos siempre ha sido una preocupación asociada a su empleo. La implementación de estrategias como los refugios libres de variedades transgénicas han ayudado a extender el tiempo de vida útil de estos cultivos, sin embargo los recientes reportes de pérdidas en la producción causados por casos de resistencia obligan a diseñar y emplear nuevas estrategias para mantener lo que hasta ahora ha sido el control de insectos plaga más amigable con el ambiente. Ante este panorama, surge en un laboratorio mexicano la toxina Cry1AbMod, una alternativa que tiene como objetivo inicial combatir a insectos resistentes a la proteína convencional. La Cry1AbMod es una variante de la proteína convencional Cry1Ab, pero que a diferencia de ésta, carece de 56 aminoácidos de su extremo amino terminal, región donde se encuentra la hélice  $\alpha$ -1. De acuerdo con el modelo de formación de poro, las nuevas toxinas no requieren de la unión al receptor de caderina, por lo que pasan directamente a ser activadas por las proteasas de intestino del insecto y a la formación del oligómero para posteriormente insertarse en la membrana del epitelio intestinal en forma de poro. La Cry1AbMod se caracteriza por ser activa contra insectos que han desarrollado resistencia a las toxinas Cry por medio de mutaciones en su receptor caderina, sin embargo su espectro de acción no ha sido caracterizado. En el presente trabajo se hace una evaluación por medio de bioensayos en diferentes especies de insectos plaga representantes del Orden Coleóptera y Lepidóptera con el objetivo de evaluar si el espectro de acción y la efectividad de la toxina Cry1AbMod tiene variaciones con respecto a la Cry1Ab. Los resultados obtenidos no apoyan cambios en el espectro de acción de la Cry1AbMod en comparación con la Cry1Ab. En lepidópteros la toxicidad de la Cry1AbMod es muy parecida a la Cry1Ab, no observándose cambios significativos. Sin

embargo al evaluar dos diferentes poblaciones *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes regiones geográficas se evidencia la variabilidad genética reflejada en la respuesta a las toxinas Cry1Ab. Esto sugiere que evaluaciones de efectividad de las toxinas Cry previas a su uso o liberación en campo son importantes para comprobar su efectividad hacia las poblaciones de insectos plaga locales.

**Palabras clave:** plantas Bt, toxinas Cry, evolución de resistencia, Cry1Ab, Cry1AbMod

# ABSTRACT

---

*Bacillus thuringiensis*, are Gram-positive bacteria, that produce crystalline parasporal inclusions containing insecticidal proteins called  $\delta$ -endotoxins (Cry toxins). Each toxin kills insects with a high degree of specificity, including many important pest insects of crops like cotton and maize. Nowadays, due to its insecticidal activity, the Cry toxins are used worldwide as sprays or in transgenic plants (Bt plants). This technology has many advantages since Bt toxins are highly specific to their target insect, are innocuous to humans, vertebrates and plants, and completely biodegradable. However the evolution of insect resistance to Bt plants threatens its future use. This may represent the loss of an alternative of an environmentally friendly insect pest control resource. Refuges of plants that do not produce Bt toxins have been used successfully for delaying insect resistance. However, recent reports of insect resistance to Bt crops and losses in production make necessary to develop new strategies to counter insect pest and delay the development of resistance to Bt crops. Cry1A<sub>Mod</sub> are a new Cry toxin made in a Mexican research laboratory that lack amino terminal end including helix  $\alpha$ -1. These toxins had the main objective to kill resistant insects affected in cadherin gene. According to the pore-formation model of the mechanism of action of Cry toxins, the binding of protease-activated toxin to cadherin receptor is essential for the removal of helix  $\alpha$ -1, which in turn promotes oligomerization. Therefore, the modified Cry1A<sub>Mod</sub> toxin lacking helix  $\alpha$ -1 forms oligomers in the absence of cadherin, forming the pore, and causing the insect death. Even though the Cry1A<sub>Mod</sub> toxin represents a high potential for its use in the field, the evaluation of its action spectrum remains uncharacterized. The aim of this work was to evaluate the insecticidal potential of the new Cry1A<sub>Mod</sub> toxin in larvae from the orders Coleoptera and Lepidoptera, and compare its toxicity with the unmodified one. The results obtained show no variation in the toxicity level between these two toxins among the different insect species analyzed. The toxicity of the Cry1A<sub>Mod</sub> and Cry1A appears to be rather similar. However, the two populations of *Spodoptera frugiperda* evaluated with Cry1A coming from different geographical areas suggest a high variability in their susceptibility to these toxins. Based in these findings, it is highly recommendable to evaluate the real susceptibility to Cry toxins on the local insects' pest previous to the application of Bt plants or Bt sprays in those particular regions.

**Key words:** Bt plants, Cry toxins, resistance evolve, Cry1A, Cry1A<sub>Mod</sub>.

## ABREVIATURAS

---

Adenilato Cilclasa	AC
Adenosín Monofosfato Cíclico	AMPc
Aminopeptidasa-N	APN
Análisis de Varianza	ANOVA
<i>B. thuringiensis</i> israelensis	<i>Bfi</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bt</i>
Caderina	CADR
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados	CINVESTAV
Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo	CIMMyT
Colegio de Postgraduados	CP
Toxina Cry1Ab convencional ó silvestre	Cry1Ab
Toxina Cry1Ab modificada	Cry1AbMod
Dosis Estimada al respectivo 50%	DE <sub>50</sub>
Dosis Letal	LC
Fosfatasa alcalina	ALP
Glicoconjugado	GCR
Glicosil-fosfatidil-inositol	GPI
Genéticamente Modificado	GM
Hectáreas	Ha
Instituto de Biotecnología	IBT
Kilo-Daltones	kDa
del inglés <i>Lethal Doses</i>	LC <sub>50</sub>
Modelo de Formación de Poro	MFP
Modelo de Transducción de Señal	MTS
N-acetilgalactosamina	GalNac
Organismo(s) Genéticamente Modificado(s)	OGM
Proteína cinansa-A	PKA
Repetición de caderina	RC
Toxinas Cry de tres dominios	Cry-3d
Toxinas Formadoras de Poro	TFP
Toxicidad Relativa	TR
Universidad Nacional Autónoma de México	UNAM

# 1. INTRODUCCIÓN

---

Desde su empleo a nivel comercial en 1996, el área de cultivo de los organismos genéticamente modificados (OGM) ha aumentado. Para el año 2009 se sembraron 134 millones de hectáreas de plantas genéticamente modificadas (GM) de diferente naturaleza, lo que representó el 7% de la superficie total cultivada (OGM y convencionales) a nivel global (James *et al.*, 2009). El cultivo de variedades genéticamente modificadas para resistir el ataque de insectos es el de mayor extensión con 21,7 millones de hectáreas sembradas a nivel mundial para el año 2009, lo que significó el 15% de todos los cultivos biotecnológicos empleados (James *et al.*, 2009). Las plantas *Bt*, llamadas así por contener genes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* son las únicas disponibles en el mercado con este fenotipo y han funcionado a los productores para controlar determinadas plagas (Blanco 2008).

Los cultivos *Bt* expresan uno ó más genes codificantes para las toxinas Cry (llamadas así porque se encuentran en forma de cristales dentro de la bacteria) y presentan una gran especificidad a las plagas que atacan (Hofmann *et al.*, 1988). Se han aislado miles de cepas de *B. thuringiensis* a partir de suelo, hojas e insectos en todo el mundo. Cada una de las cepas es diferenciada por las características de sus proteínas cristalinas, las secuencias de sus genes y su espectro de acción insecticida (Carpenter *et al.*, 2002). De la mayoría de las cepas se desconoce que proteínas Cry específicas expresan y su espectro de acción insecticida (van Frankenhuyzen *et al.*, 2009).

Hasta el momento están descritos cerca de 204 holotipos de toxinas Cry, aumentado considerablemente en los últimos años (Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Bravo, A., Dean, D.H., *B. thuringiensis* toxin nomenclature [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/); Mayo 2010), sin embargo, sólo unos cuantos (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry3A, Cry3B y Cry34/Cry35) son utilizados a nivel comercial, ya sean formulados para ser asperjados en los cultivos (en forma de spray) o en plantas GM que expresan las proteínas Cry (plantas *Bt*) (Bravo, A. y Soberón, M. 2008).

Las toxinas más comunes en el mercado pertenecen a la familia Cry1A (James 2009). La toxina Cry1Ab se utiliza ampliamente como fenotipo a expresar en maíz GM comercial, con 17 eventos documentados hasta el momento (Base de datos de Biotecnología Agrícola AGBIOS [www.agbios.com/dbase.php](http://www.agbios.com/dbase.php); Mayo 2010). Esta toxina es específica para el orden Lepidóptera (Bravo, A. y Soberón, M. 2008), y es comercializada para proteger a los cultivos del barrenador europeo, *Ostrinia nubilalis* y del gusano helotero, *Helicoverpa zea* principalmente.

El control de plagas representa uno de los mayores costos obligados de la producción agrícola a nivel mundial. Descuidar el monitoreo de los insectos plaga, podría representar un costo en términos de cosecha del 30%, por lo que su control es de carácter obligado. Los grandes productores gastan al año miles de millones de dólares, principalmente en insecticidas químicos (Kirsi-marja *et al.*, 2002.) y su uso a lo largo del tiempo ha desencadenado una serie de problemas. Los insectos blanco son expuestos repetidamente a los mismos insecticidas químicos y tienden a desarrollar resistencia, por lo que dosis más altas tienen que ser usadas, aumentando el costo y sobre todo los daños al ambiente (Bottrell y Adkisson 1977). Los insecticidas químicos son inespecíficos, por lo que al ser utilizados acaban también con los organismos benéficos asociados al agroecosistema. Por ello el uso de bioinsecticidas es una alternativa para combatir a las plagas. Los insecticidas biológicos con base en toxinas de la bacteria *B. thuringiensis* (*Bt*) son biodegradables, específicos contra el insecto plaga y amigables con el ambiente (De Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008).

Los cultivos GM de *Bt* que producen proteínas cristalinas de la bacteria *B. thuringiensis* (toxinas Cry) han proporcionado una alternativa útil para el control de plagas (Carpenter *et al.*, 2002). Sin embargo el futuro de los cultivos *Bt* también está amenazado por la evolución de resistencia por parte de los insectos blanco (Tabashnik *et al.*, 2008; Bravo, A. y Soberon, M. 2008).

Las plantas GM que expresan las toxinas Cry fueron por primera vez comercializadas en el año de 1996 en medio de la controversia donde muchos científicos y ambientalistas advirtieron de la inminente problemática del desarrollo de resistencia (Bates *et al.*, 2005), por lo que las estrategias de su manejo se convirtieron en parte del proceso de producción del cultivo GM.

## 1.1. Toxinas Cry

La bacteria *B. thuringiensis* (*Bt*) fue descubierta en Japón por el Profesor Shigetane Ishiwata mientras estudiaba una enfermedad en el gusano de seda a principios del siglo XX (Federici 2005). La descripción de la bacteria, así como la de sus propiedades insecticidas fueron publicadas y dadas a conocer diez años más tarde cuando fue aislada en la región de Thuringia, Alemania, a la cual debe su nombre. Hasta la década de los años 30's, investigadores franceses retomaron el tema de *B. thuringiensis* como insecticida y sacaron un producto al mercado conocido como "sporeina" para combatir larvas de lepidópteros en los cultivos (Federici 2005).

Miembro del grupo *Bacillus cereus* (Helgason *et al.*, 2000), *B. thuringiensis*, es una bacteria Gram-positiva entomopatógena que produce  $\delta$ -endotoxinas en inclusiones de cristal durante su fase de esporulación (Bravo *et al.*, 2007). Los cristales están formados principalmente por proteínas con acción insecticida conocidas como toxinas Cry (por su formación en cristales) y toxinas Cyt (por su acción citolítica, aunque también se acumula en cristales) (Bravo *et al.*, 2007). Su acción insecticida es altamente específica, siendo inocua para el hombre y totalmente biodegradable.

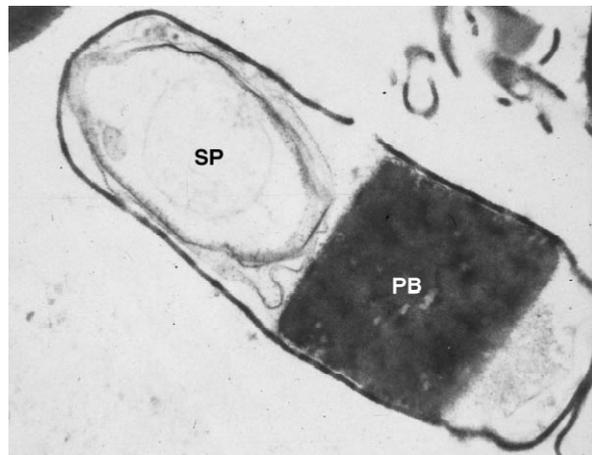


Figura 1. microscopía electrónica de transmisión de una bacteria en esporulación de *Bacillus thuringiensis*. Las  $\delta$ -Endotoxinas son producidas en cristales (Protein body, PB), a un costado de la espora (SP). La pared celular eventualmente se rompe y libera tanto la espora como el cristal con las toxinas Cry. La célula de la imagen tiene un tamaño aproximado de 2  $\mu$ m. Tomado de De Maagd *et al.*, 2001.

Las toxinas de *Bt* (Cry y Cyt) pertenecen al grupo de Toxinas Formadoras de Poro (TFP). Éstas, en general, son proteínas solubles en agua que presentan cambios conformacionales en su estructura al insertarse en la membrana celular de su hospedero (Bravo *et al.*, 2007). Existen dos grupos principales de TFP: 1) TFP- $\alpha$  y 2) TFP- $\beta$  (Parker y Feil 2005). El primer grupo tiene una parte dentro de su estructura primaria formada de  $\alpha$ -hélices que son las responsables de la formación de poro. Dentro de esta clase se encuentran las toxinas Cry de tres dominios (Cry-3d). El segundo grupo donde se

encuentran las toxinas Cyt, forman el poro con sus estructuras de hojas plegadas- $\beta$ , que se asemeja a un cilindro o barril (Parker y Feil 2005). La acción insecticida de estas toxinas, está asociada con cambios de pH y con la interacción de receptores específicos de sus hospederos (Parker y Feil 2005).

### 1.1.1. Estructura y Clasificación de las toxinas Cry.

Las proteínas Cry son definidas como cualquier inclusión proteica producida durante la esporulación de *Bt* que exhibe efectos tóxicos a organismos blanco, ó como cualquier proteína que tiene una secuencia similar a las proteínas Cry conocidas (Crickmore *et al.*, 1998). Esta definición también incluye las toxinas Cyt, pero se ha llegado a la convención de que aquellas que tengan una relación estructural con éstas, conserven el prefijo "Cyt".

Actualmente las  $\delta$ -endotoxinas Cry y Cyt se clasifican en Cry1 hasta Cry55; y de Cyt1 a Cyt2 basados en la identidad de su secuencia primaria (Crickmore *et al.*, 1998). En la Figura 2 se muestra un filograma basado en la identidad de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cry tomado de la página anteriormente citada del Comité de Miembros de Nomenclatura de las Proteínas Cry de *B. thuringiensis*. Las líneas verticales indican los límites en identidad que diferencia las categorías en la nomenclatura. El número arábigo se designa con la primera fila que corresponde hasta un 45% de identidad (por ejemplo: Cry1, Cry2, etc.). La segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78% (Cry1A, Cry1B, Cry1C...). La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95% (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac...). La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95% de identidad (Cry1Aa1, Cry1Aa2, Cry1Aa3...) (Crickmore *et al.*, 1998). Aunque esta clasificación lleva una tendencia evolutiva, las toxinas Cry se organizan en tres linajes parafiléticos diferentes (De Maagd *et al.*, 2003): **a)** Toxinas Bin-Like. En este grupo se encuentran las proteínas Cry35 y Cry36 agrupadas con las toxinas binarias de *B. sphaericus* Bin A y Bin B por tener alto grado de homología. La Cry35 se caracteriza por ser activa en forma binaria; **b)** Toxinas Mtx-like, parecidas a las proteínas Mtx producidas por *B. sphaericus*. La Cry37 y Cry23 forman una toxina binaria alternativa que junto con la Cry23 forman un grupo diverso donde se incluyen proteínas cristalinas de *B. thuringiensis var. thompsoni* (Cry15) y *var. dakota*; **c)** Toxinas

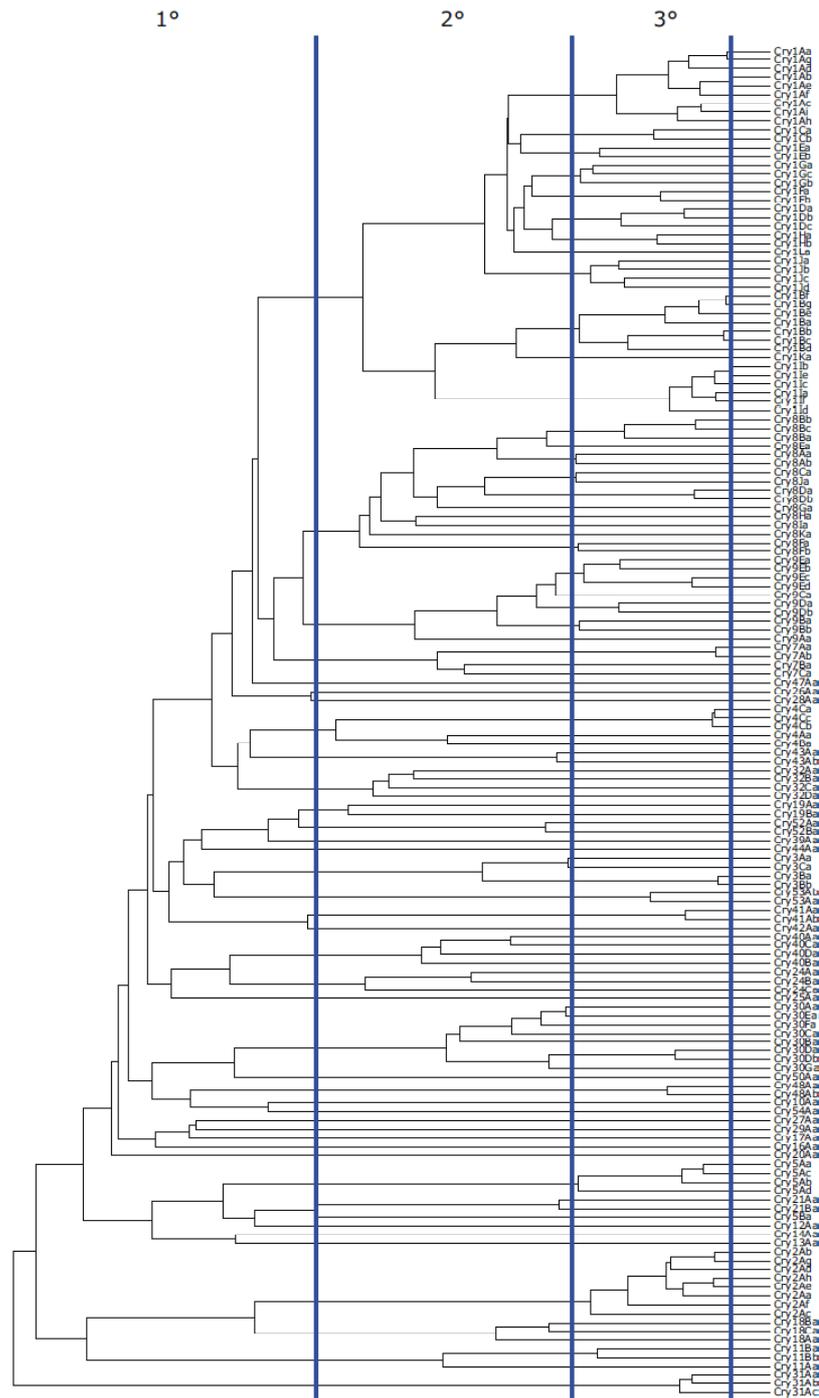
Cry de tres dominios (Cry-3d). Este último linaje es el más numeroso, y se caracteriza por sus moléculas globulares estructuradas en tres dominios unidos por enlaces simples (Figura 3). Una característica distintiva de las toxinas Cry-3d es la presencia de protoxinas con dos diferentes tamaños. Las protoxinas más grandes (de 130kDa) tienen aproximadamente el doble de tamaño que el resto (70 kDa), y se cree que la extensión C-terminal juega un papel importante en la formación de los cristales en la bacteria (De Maagd *et al.*, 2001). Ambas variedades de protoxinas Cry-3d al ser ingeridas por el insecto son cortadas por las proteasas presentes en su intestino, produciendo un fragmento resistente a proteólisis de 60kDa (Bravo *et al.*, 2007). A este monómero se le conoce como toxina activada.

Hasta el momento, se tienen determinadas las estructuras de seis proteínas Cry-3d, encontrándose un alto grado de similitud en su estructura cuaternaria (Figura 3) que podría sugerir un modo de acción parecido en sus diferentes hospederos (Bravo *et al.*, 2007). Se ha desarrollado una amplia línea de investigación con el fin de determinar las características bioquímicas de cada uno de los dominios de las proteínas Cry-3d y el papel que lleva a cabo en el modo de acción de la toxicidad.

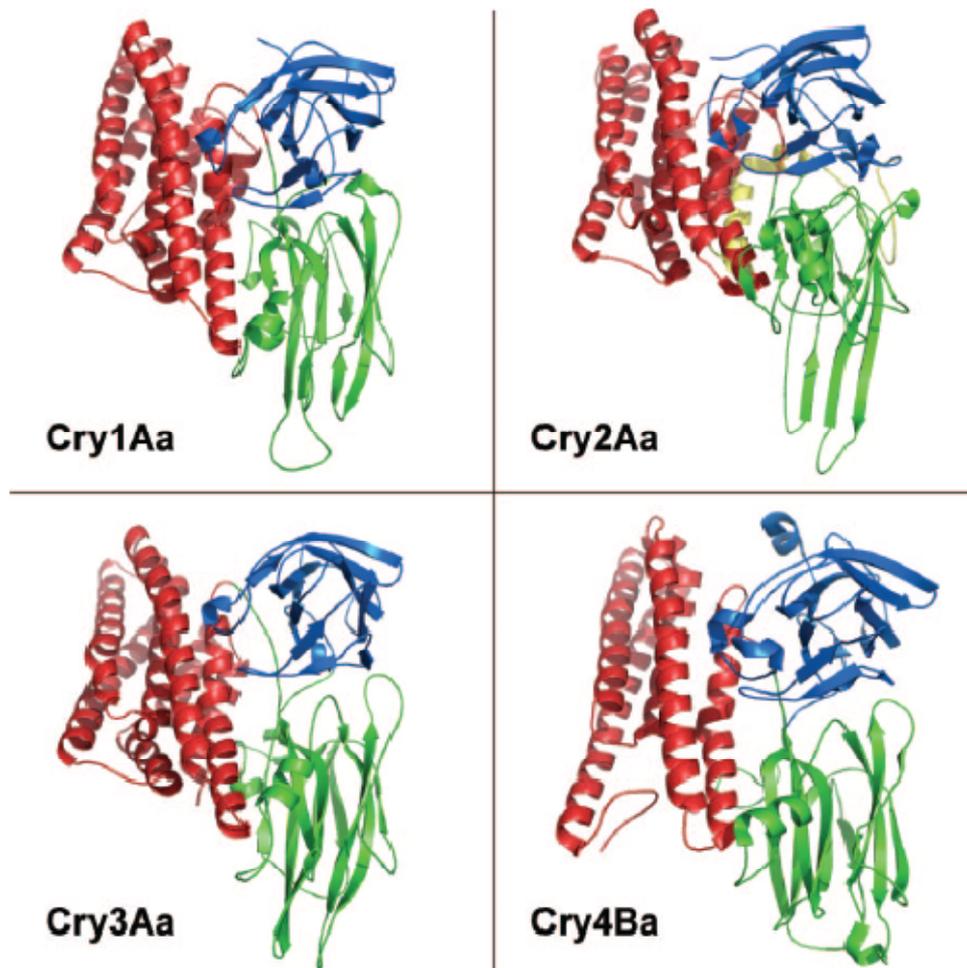
El Dominio I fue descrito por primera vez en la toxina Cry3Aa (Li *et al.*, 1991). Está conformado de siete alfa hélices antiparalelas. Seis hélices anfipáticas rodean a una central hidrofóbica. Cada una de las hélices anfipáticas presenta residuos polares en la cara externa, mientras que los residuos hidrofóbicos se orientan hacia la  $\alpha$ -hélice central. La mayoría de las hélices de este dominio son mayores a 30 Å, por lo que podrían ser capaces de atravesar la membrana celular. Este dominio está involucrado en la formación de poro e inserción en membrana. El Dominio II es el menos conservado en secuencia y estructura terciaria entre las toxinas Cry (De Maagd *et al.*, 2001). Está compuesto de tres hojas plegadas  $\beta$  antiparalelas y por tres asas. En las asas de estas láminas  $\beta$  se observa la mayor diferencia estructural. El Dominio II juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina, donde las asas interaccionan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio. Por último el Dominio III es un  $\beta$ -sándwich (Li *et al.*, 1991), formado por dos láminas plegadas  $\beta$  antiparalelas. Este dominio también está involucrado en la interacción con receptores presentes en el epitelio intestinal del insecto blanco (Bravo *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002b; Gómez *et al.*, 2003).

El estudio de los procesos evolutivos de las toxinas Cry que culminan en modificaciones en sus diferentes niveles de estructura, puede ayudar a comprender su gran diversidad, y las razones por las que su espectro de acción es limitado (De Maagd *et al.*, 2001). En este sentido, los Dominios I y II han coevolucionado. Existen evidencias de que el dominio III es una unidad evolutiva independiente dentro de las proteínas Cry, que ha llevado a generar nuevas toxinas donde ha existido un intercambio o sustitución del dominio modificando la especificidad (De Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2007). Esto podría deberse principalmente a la similitud entre los dominios, y que los genes Cry están contenidos en plásmidos y elementos transposones, que les facilita su movimiento en el genoma (De Maagd *et al.*, 2001).

## PROTEÍNAS Cry DE TRES DOMINIOS



**Figura 2. Filograma de las Proteínas Cry que comparten la estructura cuaternaria similar de tres dominios.** El filograma se realizó con base en la identidad de las secuencias de aminoácidos de las proteínas presentadas. Las líneas verticales indican porcentaje de identidad que va de 45, 45-78 y 78-95% de izquierda a derecha, y separan las diferentes categorías en la nomenclatura. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).



**Figura 3. Estructura general de las toxinas Cry de tres dominios.** A pesar de que comparten menos de la mitad de identidad en su secuencia de aminoácidos, su estructura general es muy parecida, lo cual sugiere un modo de acción insecticida similar. El Dominio I (rojo) está involucrado en la formación de poro e inserción en membrana, mientras que los Dominios II (verde) y III (azul) tienen regiones particulares de interacción con receptores secundarios, lo cual les confiere especificidad. Tomado de Piggot y Ellar 2007.

### 1.1.2. Empleo de las toxinas Cry como insecticidas

Actualmente se conocen cerca de 204 holotipos de  $\delta$ -endotoxinas Cry (Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Bravo, A., Dean, D.H., *B. thuringiensis* toxin nomenclature [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/); Mayo 2010) específicos para los órdenes de insectos Lepidóptera, Coleóptera, Himenóptera y Díptera, aunque también se han identificado algunas que son específicas contra Nemátodos (Bravo *et al.*, 2007).

A pesar de la gran diversidad, solo unas cuantas son utilizadas para uso agrícola, ya sean para ser asperjadas, ó incorporadas en el genoma de la planta (Tabla 1).

CEPA <i>Bt</i> o SUBESPECIES	ORDEN DE INSECTOS BLANCO	DELTA-ENDOTOXINAS*
<i>kurstaki</i> HD-1	Lepidoptera; Diptera	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, Cry2B
<i>thuringiensis</i> HD-2**	Lepidoptera	Cry1A, Cry1B
<i>aizawai</i>	Lepidoptera	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D, Cry1F
<i>entomocidus</i>	Lepidoptera	Cry1Aa, Cry1B, Cry1C
<i>tenebrionis</i>	Coleóptera	Cry3A
<i>israelensis</i>	Díptera	Cry4A, Cry4b, Cry4C, Cry4D

**Tabla 1. Lista parcial de Endotoxinas de diferentes cepas de *Bt*, y su espectro de actividad insecticida.** \* Todas las endotoxinas son nombradas con el sufijo Cry por la naturaleza cristalina de la proteína. \*\**B. thuringiensis* HD-2 también produce una exotoxina (secretada extracelularmente) que puede ser tóxica no sólo para insectos, sino para otros organismos. Esta cepa no se usa comercialmente en plantas *Bt*. (Modificada de Carpenter *et al.*, 2002.)

Los insecticidas a base de toxinas *Bt* más empleados por los productores (como Ciobit, Condor Cutlas, Dipel, Full-Bac, Javelin, M-Peril y MVP) están compuestos de preparaciones espora-cristal derivados de cepas silvestres de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) que expresan las proteínas Cry1A y Cry2A. Estos productos son útiles contra varios insectos que se alimentan de las hojas de la planta (Roh *et al.*, 2007). También existen productos a base de toxinas como Cry1A, Cry1B, Cry1C y Cry1D, de cepas como *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137. Éstos son eficaces contra otras plagas de lepidópteros. Algunos ejemplos de productos de *Bt* que son efectivos contra coleópteros son el M-Trak, Foil y Novodor, que contienen la proteína Cry3A de *B. thuringiensis* var. *San diego* y *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, comercializados principalmente para combatir al escarabajo colorado de la papa, *Leptinotarsa decemlineata* (Soberón *et al.*, 2009).

Los mosquitos también se controlan con éxito con toxinas Cry (Tabla 1), y productos como Vectobac, Teknar, Bactimos, Skeetal y Mosquito Attack, a base de toxinas Cry4, Cry10, Cry11 y Cyt de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), han sido desarrollados para combatir dípteros vectores de enfermedades como *Aedes aegypti*

(vector del dengue) y algunas especies de *Anopheles sp.* (vectores de malaria) (Soberón *et al.*, 2009).

Las toxinas Cry también se emplean en productos biotecnológicos. Las plantas *Bt* expresan uno o más genes de proteínas Cry. Los genes más usados son aquellos que codifican para las toxinas de la familia Cry1A, particularmente Cry1Ab y la Cry1Ac (Soberón *et al.*, 2007) en algodón y maíz GM principalmente. Estas plantas expresan continuamente las proteínas insecticidas a lo largo de su vida y en todos sus tejidos. Esto permite un control de insectos que por sus hábitos alimenticios son pobremente atacados con insecticidas tipo spray como los insectos barrenadores y plagas que se alimentan de las raíces de las patatas (Soberón *et al.*, 2007). El uso de estos cultivos *Bt* desde su introducción comercial en 1996, causó toda una revolución en la agricultura contemporánea, y cada año se emplean en más extensiones de tierra para su siembra (James 2009). Su uso tiene algunas ventajas: disminuye costos con la reducción de aplicaciones de insecticidas químicos (nocivos para la salud humana y el ambiente) y permiten un control más efectivo contra plagas (Roh *et al.*, 2007).

### **1.1.3. Modo de acción de las toxinas Cry de tres dominios**

El estudio del modo de acción de las toxinas Cry se ha llevado a cabo principalmente en Lepidópteros (Bravo *et al.*, 2007). Desde hace ya varios años se ha documentado que las proteínas *Bt* son activadas por proteasas presentes en el intestino de las larvas (Lilley *et al.*, 1980), y muestran una especificidad con sitios de unión en la membrana celular del intestino de insectos blanco (Hofmann *et al.*, 1988; Wolfersberger 1990).

Las proteínas Cry se caracterizan por ser toxinas que provocan lisis celular en el epitelio intestinal de los insectos blanco por medio de la formación de poros en las microvellosidades apicales de la membrana celular (Bravo *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2005; De Maagd *et al.*, 2001). Sin embargo existe otro modelo que trata de explicar la acción tóxica de las proteínas Cry por medio de la activación de una transducción de señales que provoca la muerte celular, sin la formación de poros (Zhang *et al.*, 2006).

### 1.1.3.1. Modelo de Formación de Poro (MFP)

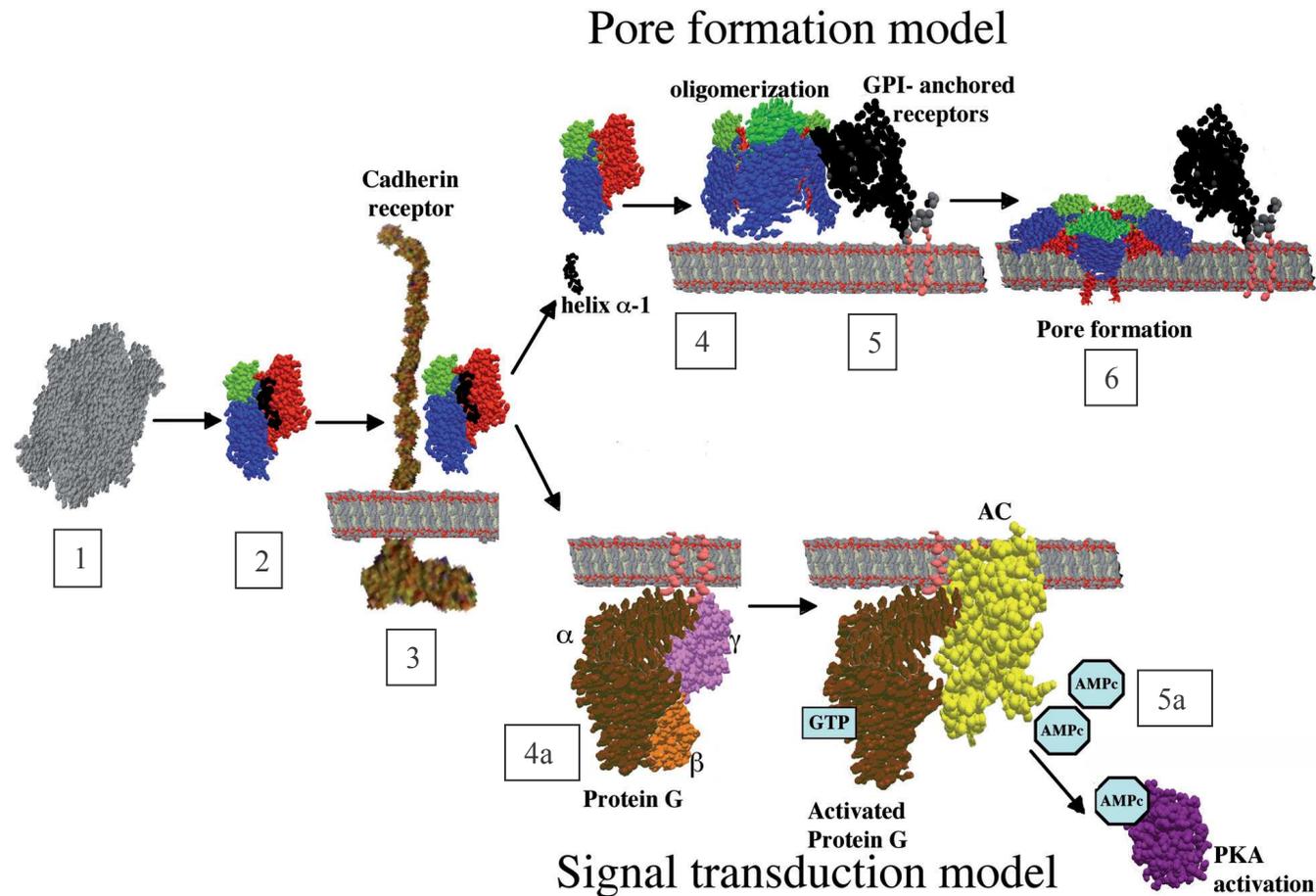
La mayoría de las proteínas Cry-3d son producidas en inclusiones cristalinas, donde se encuentran como protoxinas de entre 70 y 130 kDa aproximadamente. La larva ingiere los cristales y son solubilizados en el intestino debido a su pH alcalino, liberando las protoxinas (Bravo *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2005; De Maagd *et al.*, 2001; Parker y Feil 2005; Soberón *et al.*, 2009). Éstas son activadas por proteasas que provocan cortes en la molécula, dando como resultado una toxina de tres dominios completamente activada con un tamaño molecular aproximado de 55 a 65 kDa (Bravo *et al.*, 2007).

La activación proteolítica involucra la pérdida de el extremo N-terminal (de 25 a 30 aminoácidos para las Cry1, 58 para Cry3A y 49 para Cry2Aa) y aproximadamente la mitad del resto de la toxina con la remoción de extremo C-terminal (Bravo *et al.*, 2007). La ahora toxina Cry tiene alta afinidad hacia receptores específicos presentes en las microvellocidades celulares del intestino del insecto blanco (Bravo *et al.*, 2005; De Maagd *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 1988). Se ha observado principalmente que la caderina funciona como receptor primario el cual al interactuar con la toxina Cry provoca un cambio conformacional en la proteína que se deriva en la pérdida de la  $\alpha$ -hélice 1 en el Dominio I, que a su vez facilita la oligomerización y la formación de un pre-poro (Gómez *et al.*, 2002a).

Se ha documentado que una vez formado el oligómero, éste tiene alta afinidad hacia receptores secundarios como las Alcalino Fosfatasas (ALP) y Aminopeptidasas N (APN) (discutidos más adelante) que permiten su inserción en la membrana celular (Bravo *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2007). La inserción conlleva la formación de poros que permiten el paso de iones y agua, proceso que provoca un desequilibrio osmótico y por lo tanto lisis celular y la consecuente muerte del insecto (Gómez *et al.*, 2002a; Gómez *et al.*, 2001). Aunque no es necesario que la bacteria se reproduzca para matar, se ha documentado que la ruptura de la membrana libera los contenidos intracelulares que proveen a la espora de un medio idóneo para su germinación, provocando una severa septicemia y la muerte del insecto (Bravo *et al.*, 2005; De Maagd *et al.*, 2001) (Figura 4).

### 1.1.3.2. Modelo de Transducción de Señal (MTS)

Los pasos que van desde la solubilización del cristal hasta la interacción con el receptor caderina son los mismos que en el MFP (Figura 4). A partir de éste punto, el MTS propone que la interacción con el receptor primario (caderina) provoca la activación de una proteína G dependiente de  $Mg^{+2}$  que desencadena una cascada de señalizaciones (Zhang *et al.*, 2006). La activación de una proteína G debido a este proceso, provoca la síntesis de Adenil Ciclasa que promueve la producción de Adenosín monofosfato cíclico (AMPC) intracelular. Los altos niveles de este segundo mensajero activan la proteína cinasa A (PK-A) que es la causante de la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006). Este modelo en ningún momento considera la interacción con receptores secundarios ni la formación de oligómeros o poros en la membrana plasmática. Es importante mencionar que sus argumentos y conclusiones se basan en observaciones en modelos in vitro de cultivo de células HI5 que expresan el receptor caderina BT-R1, por lo que no toman en cuenta las características propias del epitelio intestinal del insecto.



**Figura 4. Modelos del modo de acción de las toxinas Cry silvestres de tres dominios.**

Se han descrito dos modelos: El Modelo de Formación de poro (en la ilustración, arriba) y el Modelo de Transducción de Señales (abajo); ambos concuerdan los primeros pasos del modo de acción de la toxina que incluye la solubilización de la toxina en el lumen intestinal de la larva (1), activación por proteasas intestinales (2), y la unión al receptor primario de caderina (3). En el modelo de Formación de Poro la unión de la toxina activada a caderina provoca un corte de la hélice  $\alpha$ -1 y por lo tanto la toxina se oligomeriza (4). Posteriormente el oligómero

formado se une a un receptor secundario, como aminopeptidasa o la alcalino-fosfatasa, anclados por glycosylphosphatidylinositol (GPI) a la membrana (5). Finalmente la toxina se inserta a la membrana formando un poro que la desestabiliza y provoca la muerte del insecto (6). Por otro lado el Modelo de Transducción de Señales (en la imagen, abajo) propone que la interacción de la toxina Cry con el receptor de caderina desencadena una cascada de señales intercelulares mediada por una proteína G (4a), que provoca la activación de la enzima Adenilato Ciclasa (AC) y comienza a sintetizar Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que posteriormente activa a la enzima Proteína-quinasa A (PKA) provocando la muerte celular (5a). Modificado de Soberón, *et al.*, 2009.

#### **1.1.4. Importancia de los receptores en el modo de acción de las toxinas Cry**

Una de las mayores ventajas del uso de las toxinas Cry para el control de plagas es su alta especificidad en su acción insecticida que se limita a nivel de orden como categoría taxonómica. Esta cualidad está directamente relacionada con los receptores específicos que requiere la toxina para actuar, siendo solo algunos insectos quienes los expresan, lo cual también hace imposible que pueda afectar al ser humano si los consume, pues no expresa los receptores necesarios para que se lleve a cabo su toxicidad. El estudio bioquímico de las proteínas Cry se ha enfocado principalmente en la identificación de los receptores específicos que interaccionan con ellas una vez que fueron ingeridas por un insecto blanco. Se han identificado dos tipos principales de receptores involucrados en el modo de acción insecticida de las proteínas Cry en lepidópteros: el receptor transmembranal de caderina y los receptores acoplados a membrana por medio de un grupo glicosilfosfatidil-inositol (GPI) como la Aminopeptidasa N (APN) y la Alcalino Fosfatasa (ALP).

##### **1.1.4.1. Receptor caderina en Lepidoptera**

La superfamilia de proteínas Caderina es diversa en sus funciones como en su expresión en diferentes organismos. Éstas, tienen funciones relacionadas en la adhesión celular, en la organización citoesquelética, respuesta inmune y en procesos como la morfogénesis (Angst *et al.*, 2001). Las caderinas son glicoproteínas que se caracterizan estructuralmente por su composición en “microdominios” de aproximadamente 110 aminoácidos con un enlace a calcio, también llamados repeticiones de caderina (RC). En insectos esta proteína modular presenta tres dominios: un ectodominio extracelular formado de 11-12 RC, uno transmembranal y por último el intracelular (Vadlamudi *et al.*, 1995). A diferencia de la caderina presente en vertebrados donde se encuentra localizada en el área baso-lateral de las membranas participando en el ensamblaje intercelular (Angst *et al.*, 2001), en insectos está situada en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino. Esto sucede en lepidópteros como *M. sexta*, *H. virescens* y *B. mori* (Aimanova *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005). Aunque su nivel de expresión aumenta progresivamente con el desarrollo larval, su función intrínseca en el insecto no está identificada, sin embargo se propone que tiene un papel regulador en la estabilidad del tejido (Midboe *et al.*, 2003) pero esto no explica su ausencia en el individuo adulto.

El epitelio intestinal es la zona donde actúan las toxinas Cry (Bravo *et al.*, 1992a; Bravo *et al.*, 1992b), por lo que la caderina se empezó a estudiar como probable receptor dentro de su acción insecticida. Esta proteína, es el receptor primario de las proteínas Cry1A en Lepidópteros (Gómez *et al.*, 2002a). Su naturaleza como proteína capaz de unirse a la toxina Cry1A fue por primera vez demostrada en *M. sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1993), posteriormente en *B. mori* (Nagamatsu *et al.*, 1998), *H. virescens* (Gahan *et al.*, 2001), *Pectinophora gossypiella* (Morín *et al.*, 2003), *Helicoverpa armigera* (Xu *et al.*, 2005) y *Ostrinia nubilalis* (Flannagan *et al.*, 2005). También ha sido identificado en el Díptero *Anopheles gambiae* donde es capaz de unirse a las toxinas Cry4B y Cry11A (Hua *et al.*, 2008).

Hoy en día, el receptor caderina es uno de los receptores de proteínas Cry más estudiados. Mucho de lo que se sabe ha sido dilucidado en el modelo biológico de *M. sexta*. El receptor de caderina de este lepidóptero se conoce como BT-R1, que es una glicoproteína de 210 kDa localizada en las microvellosidades del epitelio intestinal del insecto (Vadlamudi *et al.*, 1993, 1995). Sus propiedades como receptor de toxinas Cry fue demostrado por inmunohistoquímica y por su expresión en diversas líneas celulares de insectos entre ellas la de *Drosophila melanogaster* S2, células High Five “H5” y en la línea celular de mamíferos COS-7 (Keeton y Bulla 1997, Dorsch *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). La interacción Bt-R1 con la Cry1A involucra al menos tres epítopes de unión del dominio II. Estudios en *M. sexta* demostraron que existen zonas específicas de la proteína caderina que interactúa con otras del dominio II de la toxina. Estas investigaciones concluyen que la RC 7 se une específicamente al asa 2 en el Dominio II de la toxina, mientras que la RC 11 al asa  $\alpha$ 8 y 2 de la toxina Cry1Ab y el RC12 se une al asa 3 del dominio II de la Cry1Ab (Gómez *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002b; Gómez *et al.*, 2003).

La importancia agronómica del receptor de caderina se hizo patente cuando se observó que la mayoría de los eventos de resistencia estaban relacionados con la pérdida de este mismo receptor (Gahan *et al.*, 2001; Ferré y Van Rie 2002). Muchos insectos que desarrollaron resistencia a las toxinas Cry presentan mutaciones en sus genes de caderina (Gahan *et al.*, 2001; Morín *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005).

Aunque en muchos lepidópteros se tiene documentada la importancia del receptor caderina dentro del proceso insecticida (Gómez *et al.*, 2001) en otras especies se observan ciertas variaciones. Por ejemplo en un estudio donde se analizaba la toxicidad a un organismo no blanco (*B. mori*) por la Cry1Aa se encontró que con la sustitución de un residuo en la fenilalanina (F328) por la alanina en el Domino II, por medio de una técnica de mutación dirigida, provocaba una reducción en la unión a caderina de *B. mori*, siendo cuatro veces menos tóxica, mientras que mantenía la toxicidad al insecto plaga *Lymantria dispar*. Los autores sugieren que existen diferentes patrones de interacción receptor-ligando en las diferentes especies de insectos (You *et al.*, 2008). Sin embargo no todos los tipos de resistencia están ligados con este receptor. En el año 2008 se documentó un caso de resistencia en *H. zea* donde cambios en las proteasas parecen ser la causa (Anilkumar *et al.*, 2008).

#### **1.1.4.2. Receptores anclados a glicosilfosfatidil-inositol (GPI)**

La familia de enzimas aminopeptidasas N se encargan de cortar polipéptidos en zonas de aminoácidos neutros en su extremo terminal N. Sus funciones varían al encontrarse en una gran variedad de especies. En el caso específico del epitelio intestinal de lepidópteros, sus funciones se enfocan a la digestión de proteínas derivadas de la dieta del insecto, papel que comparte con algunas endopeptidasas y carboxypeptidasas. La aminopeptidasa N (APN) fue de los primeros que se asociaron con las toxinas Cry (Knight *et al.*, 1994). En lepidópteros, este receptor se encuentra anclado a la membrana a través de un grupo glicosilfosfatidil-inositol (GPI), a diferencia de cómo se encuentra en vertebrados, donde parte de su estructura en su extremo terminal N es hidrófóbica y funciona como pie de anclaje a la membrana celular (Piggot y Ellar 2007). La glicosilación es importante en la interacción de APN-Cry. Esto fue observado en la interacción de Cry1Ac con el receptor APN de *M. sexta*, donde el dominio III reconocía zonas específicas de unión de carbohidratos en aminopeptidasas N (Burton *et al.*, 1999; revisado por Piggot y Ellar 2007).

Numerosas proteínas Cry tóxicas hacia lepidópteros como Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1C y Cry1Fa han mostrado cierta afinidad de unión con receptores APN (revisado por Piggot y Ellar 2007). De acuerdo a su identidad de secuencia y características bioquímicas, los receptores APN se han dividido en 5 clases. Las toxinas

Cry1Aa y Cry1Ab tienen afinidad hacia los receptores APN incluidos dentro de la clase 1, caracterizada por una secuencia rica en treonina en su extremo terminal C. Se cree que esta región tiene numerosos sitios de glicosilación del tipo que une al grupo hidroxilo (glicosilación-O) al igual que la clase 2, que son los receptores con el mayor número de sitios de glicosilación-O y que como en el caso de la Cry1Ac es necesaria la interacción de carbohidratos como la N-acetilgalactosamina (GalNac) para la unión con la toxina (Burton *et al.*, 1999; Piggot, y Ellar 2007).

La interacción de los receptores anclados a GPI con las toxinas Cry también es compleja (Masson *et al.*, 1995). Los Dominios II y III de las proteínas Cry están involucrados en esta relación (de Maagd *et al.*, 1999). En *M. sexta* se identificaron las láminas  $\beta$ -16 y  $\beta$ -22 de la Cry1Ab pertenecientes al Dominio III como zonas específicas de contacto con APN (Gómez *et al.*, 2006). Existen evidencias de su importancia como receptor de las toxinas Cry-3d. El silenciamiento de la expresión de APN por medio de RNA de doble cadena en *Spodoptera litura*, provoca que la toxicidad de Cry1C disminuya considerablemente (Rajagopal *et al.*, 2002). Por otro lado Herrero *et al.*, 2005 demostró que la carencia de alguno de los receptores de APN identificados en *S. exigua* es constante en fenotipos de resistencia a la toxina Cry1Ca.

Otra proteína anclada a la membrana por GPI que ha sido descrita como receptora de las toxinas Cry es la Alcalino Fosfatasa (ALP). Este receptor fue primariamente documentado en *M. sexta* donde se observó su interacción con la Cry1Ac, al igual que la actina, otro probable receptor (McNall y Adang 2003). Jurat-Fuentes *et al.*, 2004 identificó el receptor Alcalino Fosfatasa en poblaciones de *Heliothis virescens* (HvALP) susceptibles y resistentes, donde estas últimas presentaban niveles bajos de expresión de HvALP, a lo que le atribuían la tolerancia a Cry1Ac.

La Alcalino-Fosfatasa y la Aminopeptidasa N al ser proteínas ancladas glicosilfosfatidil-inositol, podrían localizarse en microdominios lipídicos membranales ricos en colesterol y esfingolipidos llamados balsas lipídicas (Munro 2003). Estas balsas lipídicas ya están asociadas con las toxinas Cry (Zhuang *et al.*, 2002), además de participar en procesos dentro de otros contextos celulares donde tienen implicaciones en la migración celular, apoptosis, sinapsis, organización del citoesqueleto, y transducción de señales (Munro 2003).

En el caso de los receptores en coleópteros, una metaloproteasa transmembranal implicada entre otros en la adhesión y fusión celular llamada “ADAM” está asociada en la unión con la Cry3A en *Leptinotarsa decemlineata* (Ochoa-Campuzano *et al.*, 2007).

Mutaciones en los genes de los receptores de caderina y los anclados a GPI desencadenan una menor susceptibilidad de los insectos a las toxinas Cry (Rajagopal *et al.*, 2002; Jurat-Fuentes y Adang 2004; Herrero *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2007; Soberón *et al.*, 2009; Piggot y Ellar 2007), por lo que su estudio es de utilidad para prevenir y combatir a los insectos resistentes.

### **1.1.5. Toxinas Cry activas contra el Orden Coleóptera**

Las toxinas Cry-3d incluyen proteínas que son específicas para insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleóptera, Himenóptera y Díptera, e incluso para algunos nematodos (de Maagd *et al.*, 2003). El modo de acción de las toxinas Cry-3d se ha caracterizado extensamente para insectos Lepidópteros y Dípteros (Bravo *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2007; Jimenez-Juarez *et al.*, 2008). Las toxinas Cry-3d comparten características estructurales que sugieren un patrón general en su modo de acción para cada uno de sus insectos blanco (Slaney *et al.*, 1992; Bravo *et al.*, 2007; de Maagd *et al.*, 2001). La diferencia en que unas proteínas tengan acción en algunos insectos y no en otros varía en cada uno de los pasos de la secuencia en el proceso de acción tóxico, como cambios en la actividad de proteasas, unión a receptores primarios y secundarios, así como motivos específicos de su unión a la toxina (; Loseva *et al.*, 2002; Purcell *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 2007; Jimenez-Juarez *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 1999).

La actividad de las toxinas Cry en coleópteros presenta algunas diferencias debido al ambiente intestinal de estos insectos. Los coleópteros, a diferencia de los lepidópteros, presentan un pH intestinal neutro a ligeramente ácido (Purcell *et al.*, 1992). Las proteínas Cry específicas a coleópteros se disuelven a un pH muy alcalino o muy ácido (Koller *et al.* 1992), y al regresar a un pH neutro se precipitan (Carroll *et al.*, 1997). Se ha documentado que durante el proceso de toxicidad ocurre un evento de proteólisis intramolecular (activación) que dan como resultado péptidos que son solubles a un pH neutro y que mantienen la actividad en insectos susceptibles observándose unión a receptores de membrana (Carroll *et al.*, 1997). Se ha demostrado que algunos

coleópteros presentan actividad enzimática que reconoce sitios G de quimitripsina/catepsina que son los causantes de la activación de la Cry3A y otras toxinas recombinantes con estos sitios de reconocimiento (Walters *et al.*, 2008). De ese modo se entiende cómo es que las proteínas Cry tienen actividad a pesar del particular microambiente intestinal del coleóptero.

La proteína Cry3A fue la primera toxina descrita con acción contra coleópteros y pertenece al grupo de toxinas Cry-3d al igual que la Cry1Ab.

## **1.2. Evolución de resistencia a cultivos genéticamente modificados**

Una de las principales amenazas para la viabilidad agronómica de los cultivos *Bt* es el desarrollo de resistencia de las plagas a las toxinas que expresan estos cultivos GM (Ferré y van Rie 2002). En condiciones de laboratorio se han podido generar poblaciones de insectos resistentes a las toxinas Cry-3d (revisado por Ferré y van Rie 2002). En el caso de Lepidópteros basta con someter a las larvas a dosis muy altas de toxina y seleccionar aquellas que logran sobrevivir para seguir con la cría. Después de aproximadamente 15 a 30 generaciones, según la especie, se obtienen poblaciones genéticamente resistentes a la toxina empleada como presión de selección. Las rutas genéticas de la evolución a resistencia se han investigado, y hasta el momento se conocen varios mecanismos que han permitido a los insectos resistir la toxicidad de las proteínas Cry.

### **1.2.1. Mecanismos de resistencia a toxinas Cry en insectos**

#### **1.2.1.1. Cambios en la activación proteolítica**

La activación de la proteína Cry es de los primeros pasos necesarios para que el proceso de intoxicación. Modificaciones en este aspecto impediría la correcta transición de la protoxina a la toxina activa. Esto traería como consecuencia desde un desempeño tóxico poco eficiente, hasta la toxicidad nula. Existen poblaciones resistentes de *Plodia interpunctella* y *Heliothis virescens* atribuibles a cambios en sus proteasas que impiden la correcta activación de las proteínas Cry (Oppert *et al.*, 1997; Forcada *et al.*, 1996). Sin embargo estos casos han sido únicamente documentados en laboratorio y no en campo.

La presencia de este tipo de mutaciones en el campo sería difícil, ya que los costos fisiológicos para el insecto son altos. Alteraciones en sus proteasas afecta directamente su capacidad de nutrición, ya que estas proteínas degradan los alimentos que consumen permitiéndoles absorberlos (Gassman *et al.*, 2009).

#### **1.2.1.2. Cambios en la unión a receptores**

La mayoría de los insectos que desarrollan resistencia a las toxinas Cry-3d tienen alguna mutación en los receptores involucrados en el mecanismo de acción (Bravo y Soberon 2008; Caccia *et al.*, 2010). Plagas como *S. exigua* (Herrero *et al.*, 2005), *H. virescences* (Gahan *et al.*, 2001), *Helicoverpa armigera* (Xu *et al.* 2005; Yang *et al.*, 2007), *Pectinophora gossypiella* (Morín *et al.*, 2003) utilizan mecanismos de evasión de la toxina Cry por medio de modificaciones en los receptores de estas proteínas. En laboratorio el mecanismo más común de resistencia observado ha sido el desarrollo de mutaciones en el gen de caderina (Griffitts y Aroian 2005; Bravo y Soberón 2008), conocido como resistencia Modo I, caracterizado por ser un carácter recesivo, presentar una resistencia a determinada(s) toxina(s) Cry1A de por lo menos 500 veces mayor a una susceptible y reducidos niveles de unión de la toxina a preparaciones de membranas celulares del epitelio intestinal del insecto (Tabashnik *et al.*, 1998). Si consideramos que existen poblaciones de insectos como una de *S. exigua* que es resistente a las toxinas Cry por la ausencia del receptor aminopeptidasa N (Herrero *et al.*, 2005), que según el modelo de formación de poro es un receptor secundario que facilita la inserción del oligómero a la membrana, podríamos hablar que se trata de una evidencia que apoya este modelo.

#### **1.2.1.3. Respuesta inmune.**

Al igual que todo organismo, los insectos tienen procesos celulares intrínsecos que les permiten defenderse de agentes extraños que pudieran causarles algún daño. Recientemente se documentó un mecanismo de tolerancia en insectos donde una fuerte respuesta inmune del insecto dirigida las proteínas Cry es suficiente para tolerar la toxicidad. En Australia se documentó el caso de una población de *H. armigera* resistente a Cry1Ac, en cultivos de algodón GM que es cultivado en esta zona desde 1996 (algodón Ingard). Los autores estudiaron el mecanismo de resistencia y encontraron que está asociada a una elevada producción intestinal de esterasa que se ha observado secuestra

a la protoxina ó a la toxina ya activada, impidiendo su unión a receptores (Gunning *et al.*, 2005). Estudios de bioensayos arrojan una tolerancia a la toxina Cry1Ac de *H. armigera* 275 veces mayor a la susceptible. En otros casos se ha observado que la resistencia está relacionada con la producción de proteínas pro-coagulantes como la lipophorina en *Ephestia. kuehniella* (Mahbubur *et al.*, 2007) y hexamerinas para Cry1Ac en *H. armigera* (Ma *et al.*, 2005).

### **1.2.2. Factores que influyen en el desarrollo de resistencia.**

A diferencia de la aplicación de insecticidas por aspersión, los cultivos *Bt* tienen algunas particularidades que se deben tomar en cuenta al hablar del potencial de los insectos a formar poblaciones resistentes. Esto se debe principalmente al hecho de que las plagas presentes en los cultivos *Bt* están constantemente expuestas a una presión de selección ya que estos cultivos GM expresan las toxinas Cry en todos sus tejidos en altas concentraciones y de manera permanente. Estas condiciones donde el empleo del mismo insecticida y a altas dosis, constituye una presión de selección alta que potencia el desarrollo de resistencia.

Aunado a estas variables específicas de los cultivo *Bt*, existen otros factores que son parte del sistema que influye en el desarrollo o no de resistencia de las plagas a las proteínas Cry. Estos incluyen la herencia del carácter de resistencia, la frecuencia inicial de alelos de resistencia, comportamiento de los insectos, interacciones multitróficas, prácticas del manejo de las plagas, la dinámica de las poblaciones de las plagas, y los costos en la viabilidad biológica de los insectos resistentes (Georghiou y Taylor 1986; Revisado por Gassmann *et al.*, 2009).

#### **1.2.2.1. Factores Genéticos**

Los insectos que presentan resistencia a los insecticidas existen antes de que sean sometidos a dicho agente tóxico, a esto se le llama variabilidad genética. En una población donde la diversidad genética es alta, cada individuo va a responder de manera diferente a algún estímulo, en este caso el estímulo es la toxina Cry. Esto se debe a que la variación se da a nivel individuo. Cada población sometida a esta presión de selección tendrá un comportamiento diferente dependiendo los siguientes puntos:

- Frecuencia inicial de alelos de resistencia.
- Número de alelos de resistencia
- Dominancia de los alelos de resistencia.

Los alelos de resistencia están presentes en la población antes de ser expuestos a la presión de selección. Su frecuencia varía de  $10^{-2}$  a  $10^{-13}$  (Georghiou y Taylor 1977; Whitten y McKensie 1982). Afortunadamente en los casos de resistencia que se han documentado son de carácter recesivo, lo cual los hace más fácil de manejar (Tabashnik *et al.*, 2008). El carácter de resistencia para los insectos es muy costoso fisiológicamente (Gassman *et al.*, 2009), por lo que la resistencia es inestable.

#### **1.2.2.2. Factores Ecológicos y Biológicos**

Antes de un estímulo de presión selectiva como es la aplicación de insecticida, los insectos tienen un desempeño y una adecuación que depende de las condiciones naturales del ambiente donde se desarrollan. Cuando las poblaciones se sometieron a un agente selectivo como las toxinas Cry, sobreviven los individuos resistentes. En general, en ausencia de presión de selección, los individuos resistentes tienen menos adecuación y capacidad biológica que aquellos que son susceptibles (Georghiou y Taylor 1986; Gassman *et al.*, 2009). Esto les da muchas desventajas que en ausencia de la presión selectiva tiene una repercusión directa en su desempeño biológico. Factores ambientales como las bajas temperaturas en invierno, depredadores y la selección sexual, hacen menos probables que los individuos resistentes sobrevivan.

#### **1.2.2.3. Factores del Cultivo *Bt***

En el caso de los cultivos *Bt*, el porcentaje de mortalidad está directamente relacionado con el nivel de expresión de la toxina *Bt*. Este argumento se aplica cuando la resistencia es recesiva, ya que altos niveles de expresión de la toxina asegura que los individuos heterocigotos sean eliminados (Gould 1994; Bates *et al.*, 2005). De esta manera se disminuye la probabilidad de que se lleguen a formar más individuos resistentes (Roush y Daly 1990). Para que la expresión de la toxina sea alta, ésta deber

ser 25 veces más de lo necesario para matar a una larva completamente susceptible (U.S. EPA 1998).

### **1.3. Bioensayo**

La potencia de un insecticida se estima por medio de la respuesta del insecto a diferentes dosis de insecticida por medio de un bioensayo. Su uso requiere la estandarización de procedimientos para minimizar la variación y hacer comparables los datos (Burges y Thomson 1971).

En un bioensayo un cierto número de insectos se exponen a dosis conocidas del insecticida y se estiman variables como mortalidad, pérdida de peso, larvas que llegan al tercer instar y tiempo transcurrido para la muerte del insecto.

En un bioensayo se utiliza un rango amplio de concentraciones del insecticida. La transformación de los valores de mortalidad a la escala probit y la dosis a logaritmo permiten hacer estimaciones de las concentraciones necesarias para eliminar al 50% de la población, llamada  $CL_{50}$ . Estos parámetros permiten estimar la potencia de un insecticida con respecto a otro en la especie de insecto evaluada.

La variación natural es un factor inevitable en los bioensayos (Robertson *et al.*, 1995). Los bioensayos pueden variar según la hora, la estación del año, y por la misma variabilidad que presentan los insectos, sin embargo nos permite hacer una evaluación muy precisa de la susceptibilidad de los insectos plaga (Burges y Thomson 1971). El bioensayo es la principal herramienta para el monitoreo de la resistencia en los cultivos *Bt* (Tabashnik 2008), y un recurso insustituible para la evaluación de nuevos insecticidas.

### **1.4. Especies de estudio**

#### **1.4.1. *Tribolium castaneum* Herbst (COLEOPTERA: TENEBRIONIDA)**

El género *Tribolium* consta de 36 especies descritas. Diez de las cuales se han convertido en plagas de granos almacenados (Nakakita *et al.*, 1983 citado por Angelini y Jockusch 2008) entre ellas *T. castaneum*. En general los Tenebriónidos están adaptados

a vivir en zonas áridas (Duncan FD. 2003) lo cual permite inferir que en el caso de las especies plaga existió una preadaptación a vivir en condiciones de poca humedad al tener una gran capacidad de retención de agua (Angelin y Jockusch 2008).

*T. castaneum* tiene una distribución cosmopolita, aunque predomina en regiones tropicales. Es capaz de sobrevivir en regiones frías, en el interior de los molinos, panaderías o lugares con calefacción. Se alimenta de cereales quebrados o que han sido dañados por otros insectos, productos de la molienda de los cereales como harina, salvado, semillas oleaginosas y sus productos, nueces, almendras partidas, maní, alimentos suaves o molidos como galletas, cacao, concentrados alimenticios para animales, frutas secas y otros productos.

Las hembras ovipositan hasta 450 huevos entre la harina o residuos de los granos. Los huevecillos están cubiertos por una secreción pegajosa, que permite que se adhieran a las superficies y facilita la infestación. Los huevos eclosionan después de 5 a 12 días, dando origen a pequeñas larvas delgadas cilíndricas de color blanco, que llegan a medir 5mm. El ciclo completo, dependiendo de la temperatura, demora de 6 a 8 semanas y los adultos viven de 12 a 18 meses. El ciclo biológico de *T. castaneum* a  $35\pm 37^{\circ}\text{C}$  y 70% de humedad relativa dura aproximadamente 20 días. La temperatura para su desarrollo varía de 20 a  $40^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa de 30 a 90%. A menos de  $20^{\circ}\text{C}$  la larva se desarrolla pero la pupa no es capaz de transformarse en adulto (Dell'Orto H. T. *et al.*, 1985).

#### **1.4.2. *Leptinotarsa texana* Schaeffer (Coleóptera: Chrysomelidae)**

El escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) es un coleóptero de la familia de los crisomélidos de amplia distribución mundial asociado a los lugares de cultivo y almacenamiento de papa, sobre los que actúa como plaga. Mide unos 10 mm y posee un patrón característico de coloración sobre sus élitros amarillentos, consistente en cinco rayas oscuras por élitro. En origen, la especie estaba restringida al Norte de América; no obstante, su área de distribución se expandió conforme lo hacía su planta hospedera.

### **1.4.3. *Galleria mellonella* L. (Lepidóptera, Pyralidae)**

También conocida como la polilla de la cera, *G. mellonella* es la plaga más importante de los panales de abejas. El adulto es de color café pardo, y vive de 2 a 6 semanas aproximadamente, dependiendo de las condiciones ambientales. Los adultos emergen de la pupa y dejan el panal para aparearse. Posteriormente las hembras se dirigen a un panal y depositan aproximadamente 500 huevos en las ranuras de la cera mientras las abejas descansan. Las larvas emergen a los pocos días, y están completamente adaptadas a la vida en la colonia de abejas. A diferencia de larvas de otras especies, éstas son muy rápidas en su desplazamiento, lo cual les permite distribuirse en todo el panal en pocas horas. Después de unos días forman canales por donde se desplazan, que durante su desarrollo van haciendo más grandes hasta alcanzar más de 15 cm de longitud. Esta plaga es particularmente seria en zonas con climas cálidos. Su ciclo de vida se completa aproximadamente en un mes (Burges 1978).

### **1.4.4. *Spodoptera exigua* Hubner y *Spodoptera frugiperda* Smith (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

El gusano soldado, *Spodoptera exigua* Hubner, es una de las plagas más importantes a nivel mundial por su amplia distribución geográfica y sus hábitos polívoros afectando una amplia gama de cultivos de importancia económica (Hernández-Martínez *et al.*, 2008).

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, constituye la plaga más importante del cultivo del maíz en diferentes países de la región Neotropical. En este cultivo causa destrozos desde la etapa de plántula temprana hasta la pre-madurez (Ortega 1987), por lo que las pérdidas por esta plaga son cuantiosas. Al igual que el gusano soldado tiene hábitos polívoros, encontrándose en más de 80 especies de 23 familias de plantas hospederas (Pashey 1988; Andrews 1988).

En la actualidad una de las formas de combatir estas plagas es por medio de insecticidas químicos como metomilo, mipermetrina, y carbarilo, con los efectos al ambiente que lo acompañan (Hernández-Martínez *et al.*, 2008, Monnerat *et al.* 2006). Ante este panorama el empleo de toxinas *Bt* ya sea en cultivos GM o como productos de

aspersión son una alternativa para su control. A pesar de que de la Cry1Ab ha resultado poco eficiente para el control de *S. exigua* (De Maagd *et al.*, 2001), se ha visto que depende mucho de la variabilidad de la población ó cepa evaluada (Hernández-Martínez *et al.*, 2008). Para el caso de *S. frugiperda*, la información existente sobre su susceptibilidad a las toxinas Cry es limitada, y presenta una amplia gama de respuestas a estas toxinas debido a la gran diversidad genética que presenta (Monnerat *et. al.* 2006).

## 2. ANTECEDENTES

---

De acuerdo con la EPA (1988), el reto consistía en mantener la susceptibilidad de las poblaciones controladas con plantas *Bt* por al menos 10 años. Por otro lado otros creían que al cabo de tres años del cultivo de plantas *Bt* se empezarían a ver casos de resistencia en campo. Pero no fue sino hasta después de 13 años de su empleo que se documentó el primer caso de resistencia a plantas *Bt* en campo (Tabashnik *et al.*, 2008). El pronóstico de tiempo de vida útil de los cultivos resistentes a insectos se ha rebasado (Soberon *et al.*, 2007). A la fecha, se han documentado cuatro especies de insectos que desarrollaron resistencia a las toxinas *Bt* en campo (Tabla 2), una a causa del uso de insecticidas *Bt* por aspersión, y tres en cultivos *Bt* (Van Rensburg 2007; Tabashnik *et al.*, 2008; Matten *et al.*, 2008). Kruger *et al.*, reportó en 2009 daños en los cultivos *Bt* de maíz en Sudáfrica a causa de la inminente resistencia de *Busseola fusca* a la Cry1Ab. El daño en los cultivos paso de 2.5% en el periodo de cosecha del 2005-2006 al 58% en el mismo periodo del 2007-2008. Este hecho lleva al desarrollo de resistencia a los cultivos *Bt* a una problemática real, a diferencia de lo que se observó en el primer caso de resistencia documentado un año antes cuando a pesar de la presencia de poblaciones de *H. zea* resistentes a cultivos de algodón *Bt* en E.U.A. no se observaban daños directos en la cosecha (Tabashnik *et al.*, 2008). Otro caso reportado sobre un brote de resistencia fue el del gusano cogollero *S. frugiperda* en Puerto Rico (Matten *et al* 2008). Este insecto desarrollo resistencia en tiempo récord al cultivo de maíz *Bt* que expresa la toxina Cy1F comercializado por Dow Agro-Sciences y Pioneer Hi-Bred International. Este evento sólo llevaba 4 años de cultivarse cuando se presentaron los primeros daños por la plaga resistente (Matten *et al* 2008). El evento fue retirado del mercado para aquel país por las transnacionales productoras de semillas. Estos casos, son sin duda un llamado de atención y que si bien han funcionado los programas de monitoreo, el desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías es prioridad. A diferencia de los reportes de poblaciones resistentes para *H. zea*, donde éstas no representaban en el momento una amenaza para la viabilidad de los cultivos *Bt* y todas las ventajas ambientales y económicas de su uso (Tabashnik *et al.*, 2008), es sólo cuestión de tiempo para que casos como los de *B. fusca* en África y *S. frugiperda* en Puerto Rico, se hagan globales.

Especie	Lugar	Toxina	Cultivo	Empleo <i>Bt</i>	Referencia
<i>P. xylostella</i>	Filipinas, Hawaii, Florida, Malasia	Dipel, Cry1Ca, Javelin, Cry1Aa, Cry1Ac	Crucíferas (brócoli)	Aspersión	Ferré y Van- Rie 2002
<i>Busseola fusca</i>	Sur Africa	Cry1Ab	Maíz	Cultivos <i>Bt</i>	Van Rensburg, J.B.J. 2007
<i>Helicoverpa zea</i>	E.U.A	Cry1Ac	Algodón	Cultivos <i>Bt</i>	Tabashnik <i>et al.</i> , 2008
<i>S. frugiperda</i>	Puerto Rico	Cry1F	Maíz	Cultivos <i>Bt</i>	Matten <i>et al.</i> , 2008

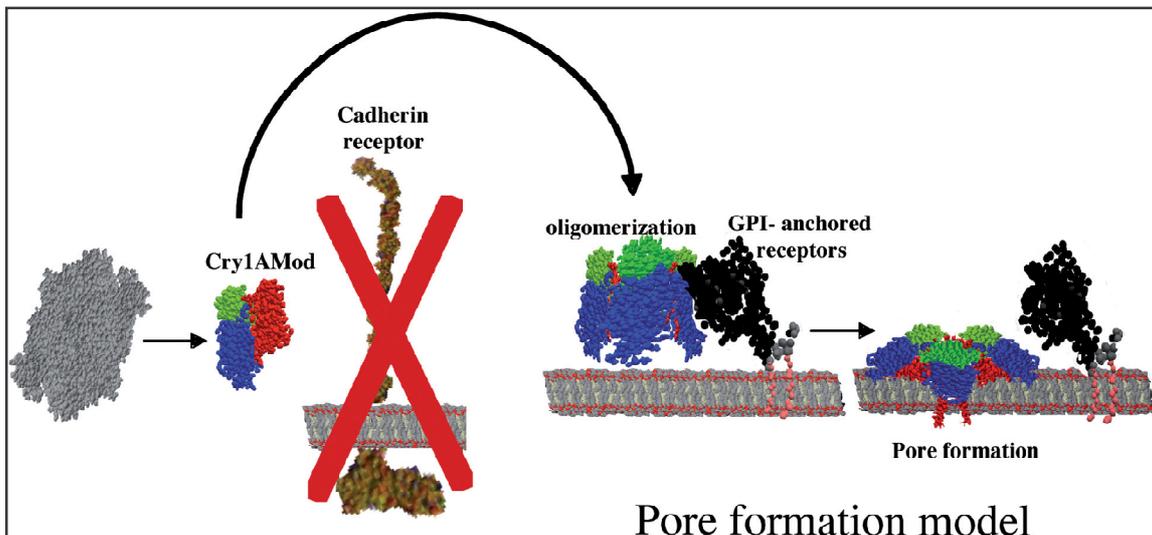
**Tabla 2.** Casos documentados de resistencia a toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

Las toxinas más comúnmente utilizadas en el campo pertenecen a la familia Cry1A (James, C. 2009), principalmente la Cry1Ab en maíz *Bt* (ej. evento MON 810) y la Cry1Ac en algodón GM (ej. evento MON531) que matan a larvas de lepidópteros. La mayoría de los casos de resistencia en insectos seleccionados en laboratorio tienen modificaciones en sus receptores de las toxinas Cry, por lo que se piensa que en el campo es más probable que los insectos desarrollen resistencia por medio de este mecanismo (Ferré y Van-Rie 2002; Caccia *et al.*, 2010).

De acuerdo con el modelo de formación de poro, antes discutido, la unión de la toxina activada a la caderina es esencial para promover un último corte que resulta en la remoción la hélice  $\alpha$ -1, lo cual induce la oligomerización (Gómez *et al.*, 2002a; Soberón *et al.*, 2007). Previos ensayos de mutaciones dirigidas que resultaron en toxinas incapaces de oligomerizar, no afectaban la unión a caderina, sin embargo la toxicidad de la proteína era seriamente disminuida (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007), lo cual demostraba que la unión de la toxina al receptor de caderina no es suficiente para provocar la muerte del insecto, por lo que se requiere de la formación del poro. El oligómero al formar el pre-poro es la etapa más importante y definitiva en la toxicidad de las proteínas Cry en lepidópteros (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007). Por ello, los grupos de la Dra. Alejandra Bravo y del Dr. Mario Soberón del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) formuló y probó la

hipótesis que afirmaba que la carencia de la hélice  $\alpha$ -1 en la toxina Cry1A le permitiría oligomerizar sin la necesidad de unión a la caderina (Soberón *et al.*, 2007).

Por medio de ingeniería genética crearon dos variantes de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, la Cry1AbMod y la Cry1AcMod respectivamente. Estas toxinas modificadas, carecen de 56 aminoácidos de su extremo amino terminal, región donde se encuentra la hélice  $\alpha$ -1. El descubrimiento publicado en la revista Science, menciona que las proteínas modificadas sin la hélice  $\alpha$ -1 fueron probadas con larvas de *Manduca sexta*, a las cuales se les silenció el gen de caderina utilizando RNA de interferencia, por lo que eran menos susceptibles a las toxinas convencionales, pero mostraron susceptibilidad a las modificadas, lo cual confirmó la hipótesis (Soberón *et al.*, 2007). Estas toxinas también se evaluaron en colonias resistentes a las toxinas convencionales de *Pectinophora gossypiella* que presentan mutaciones en el gen de caderina donde se demostró que la toxina Cry1AbMod tenía una gran efectividad, y a pesar de su resistencia fue capaz de matar a esta población (Soberón *et al.*, 2007).



**Figura 5. Modo de acción de las toxinas Cry1AMod.** Las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod carecen de la hélice  $\alpha$ -1, por lo que la unión al primer receptor de caderina (que provocaba la remoción de dicha estructura) ya no es un paso en el modo de acción de las proteínas modificadas. Posterior a este paso, el proceso de toxicidad es el mismo que el de las toxinas silvestres (Muñoz-Garay *et al.*, 2009). (Modificado de Soberón, *et al.*, 2009).

Recientemente se publicó el mecanismo de acción de la nueva Cry1AbMod, donde fue observada una actividad muy similar a la de Cry1Ab convencional, exceptuando el paso de unión al receptor caderina (Muñoz-Garay *et al.*, 2009). Las nuevas toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod son hasta el momento las únicas en su tipo y prometen ser la opción ante una amenaza de resistencia por parte de los insectos plaga, sin embargo es necesario evaluar el espectro de acción que tienen tanto en otras plagas como en organismo no blanco, como parte de un protocolo de análisis de riesgo previo a una posible liberación comercial. Caracterizar las toxinas puede darnos posibles medidas de bioseguridad y más conocimiento de su modo de acción.

Especie	Susceptible	Resistente	Referencia
<i>Manduca sexta</i>	+	+	Soberón <i>et al.</i> , 2007; Muñoz-Garay <i>et al.</i> , 2009
<i>Pectinophora gossypiella</i>	+	+	Soberón <i>et al.</i> , 2007
<i>Heliothis virescence</i>	+	+	Comun. Personal Dra. Bravo
<i>Trichoplusia ni</i>	+	+	Franklin <i>et al.</i> , 2009
<i>Plutella xylostella</i>	+	+	Comun. Personal Dra. Bravo
<i>Helicoverpa zea</i>	+	-	Comun. Personal Dra. Bravo
<i>Diatraea saccharalis</i>	+	+	Comun. Personal Dra. Bravo
<i>Aedes aegypti</i>	-	ND	Muñoz-Garay <i>et al.</i> , 2009
<i>Anopheles albimanus</i>	-	ND	Muñoz-Garay <i>et al.</i> , 2009

**Tabla 3.** Especies de insectos en los que se han probado las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod. (+) La toxina fue efectiva. (-) La toxina no presentó efectos en el desarrollo de los insectos. (ND) No existen

Desde que fue publicado el trabajo (Soberón *et al.*, 2007) la Cry1AbMod y la Cry1AcMod se han probado en diversas plagas a nivel mundial tanto en cepas susceptibles como resistentes a las proteínas convencionales (Tabla 3). En el caso de *T. ni*, se realizaron bioensayos con poblaciones resistentes y susceptibles tanto con la Cry1Ab convencional y la nueva Cry1AbMod (Franklin *et al.*, 2009). A pesar de que el receptor de caderina no se ha descrito para *T. ni*, la toxina Cry1AbMod fue más efectiva con la población resistente que la Cry1Ab convencional. Paradójicamente, en la población susceptible la Cry1Ab tuvo un mejor desempeño que la Cry1AbMod (Franklin *et al.*, 2009).

En el caso de la protección al ambiente un tema importante son los efectos a organismos no blanco. Existen un sin número de discusiones acerca si los cultivos que expresan toxinas Cry de *B. thuringiensis* pueden dañar a organismos diferentes a las plagas que se pretenden controlar con su uso. Existen varios estudios a largo plazo donde son evaluados efectos potencialmente negativos de los organismos genéticamente modificados en parasitoides, depredadores naturales (Romeis *et al.*, 2006), polinizadores y mariposas (Sanvido *et al.*, 2007). Mucha de esta fauna juega un papel importante para el control natural de plagas como lo son los depredadores naturales incluyendo a los parasitoides, o bien tienen importancia como polinizadores, tal es el caso de las abejas y mariposas. Lo importante de estos estudios es justificar que los insectos realmente se encuentren involucrados en el sistema agrícola y tengan un contacto directo o indirecto en algún nivel trófico con la toxina. Por estos motivos el proyecto contempla realizar bioensayos de susceptibilidad de organismos plaga de diferentes órdenes, así como un representante de la fauna silvestre que se encuentra asociada al agroecosistema (Tabla 4).

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>
Gusano soldado	<i>Spodoptera exigua</i>
Cogollero	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Gorgojo de la harina	<i>Tribolium castaneum</i>
Polilla de la cera	<i>Galleria mellonella</i>
Escarabajo defoliador	<i>Leptinotarsa texana</i>

**Tabla 4.** Lista de insectos que serán evaluados con las toxinas Cry1Ab y Cry1AcMod.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

El principal riesgo en el empleo de los cultivos *Bt* es la eventual evolución de resistencia por parte de estos. Lo cual limita el tiempo de vida útil de lo que hoy en día es el bioinsecticida con menos repercusiones ambientales que se haya empleado en la agricultura. El diseño y evaluación de nuevas estrategias como la que representa la toxina Cry1AbMod abre la puerta a una nueva generación de insecticidas biológicos. La caracterización del espectro de acción y por lo tanto de su utilidad en insectos plaga de importancia es parte de un protocolo de evaluación y validación de su potencial como insecticidas para su liberación y uso en campo.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

La hipótesis de este trabajo considera que la toxina Cry1AbMod al carecer de la hélice  $\alpha$ -1 y por lo tanto prescindir del paso que involucra su unión al receptor caderina, puede desencadenar alteraciones en su espectro de acción y especificidad.

### **Objetivo General**

Contribuir a la caracterización del espectro de acción de la toxina Cry1AbMod, así como comparar su efectividad con la toxina convencional por medio de bioensayos de susceptibilidad en insectos.

### **Objetivos Particulares**

Evaluar la susceptibilidad de *Spodoptera exigua*, *Tribolium castaneum*, *Galleria mellonella* y *Leptinotarsa texana* a las toxinas Cry1Ab y Cry1AbMod, y observar si existen diferencias en cuanto a su toxicidad.

Evaluar la susceptibilidad de dos poblaciones de *S. frugiperda* de diferentes orígenes geográficos a la toxina Cry1Ab, y observar si presentas diferencias.

Con base en los resultados, proponer medidas de evaluación previas a su uso como insecticida de aspersión o como cultivos *Bt*, de manera que se garantice su efectividad.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### δ-endotoxina Cry1Ab y Cry1AbMod

Las bacterias *Bt* transfectadas con los genes de la toxina Cry1AbMod o Cry1Ab se cultivaron en un medio de esporulación HTC suplementado con 10 µg/ml eritromicina durante tres días a 30 °C. La composición del medio HTC es la siguiente (gl<sup>-1</sup>): Bacto Tryptone (Difco), 5; Casamino acids (Difco), 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.4; MgSO<sub>4</sub>·7-H<sub>2</sub>O, 0.012; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.0003; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0028; el pH fue ajustado a 7.2. Una vez esterilizado se le añadió (gl<sup>-1</sup>): (SO<sub>4</sub>)·7H<sub>2</sub>O, 0.02; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.147; y glucosa, 3. La cepa que expresa la Cry1AbMod produce cristales bi-piramidales al igual que la Cry1Ab convencional.

### **Bioensayos Coleópteros: *L. texana* y *T. castaneum***

#### Cría de Insectos

Las colonias de *L. texana* y *T. castaneum* usadas para estos bioensayos son provenientes del CINVESTAV Unidad Irapuato.

#### Cría de *L. texana*

*L. decemlineata* fue sustituido en el bioensayo por la especie cercana de *L. texana* (Jacques 1988), ya que este experimento se llevó a cabo en una zona libre de la plaga. La cría se mantuvo estandarizada a base de *Solanum elaeagnifolium* Cav. (Solanales: Solanaceae), el hospedero natural de este coleóptero (Cuda *et al.*, 2002). Las condiciones de cría fueron constantes para todas las etapas de desarrollo a una temperatura de 28±2 °C, humedad relativa de 70±10%, y con un fotoperiodo de 16 horas luz.

Los adultos se mantuvieron con planta fresca en contenedores rectangulares donde las hembras ovipositaban durante un periodo aproximado de cinco días. Los

huevecillos se colectaron tres veces por semana en cajas petri, donde se conservaron en incubación de tres a cuatro días. Las larvas neonatas (y hasta la fase del 4to instar) se mantuvieron en contenedores cilíndricos donde se alimentaban de hojas frescas, mismas que eran sustituidas una vez agotadas por su consumo. Las pre-pupas se colocaron en contenedores con vermiculita y se incubaron en condiciones de insectario durante un periodo de 10 a 12 días. Una vez que el adulto emergió, se colocaron nuevamente en los contenedores de oviposición para completar el ciclo.

#### Cría de *T. castaneum*

Todas las etapas de desarrollo de *T. castaneum* se mantuvieron en una dieta a base de harina integral y levadura a una proporción de 10:1. La dieta preparada se transfirió a un frasco de vidrio de 3L de capacidad, donde se conservó durante 72 horas a -20°C para eliminar la contaminación de otros organismos que pudieran dañar la cría. Los adultos se transfirieron a la dieta en donde las hembras ovipositaban, emergían las larvas y se desarrollaban hasta la etapa adulta. Cada mes se transfirieron los nuevos adultos a frascos con dieta nueva para recomenzar el ciclo.

#### Bioensayo

##### Bioensayo *L. texana*.

Se utilizó el método de bioensayo propuesto por De León-Ibarra (De León e Ibarra 1995.), que se basa en el factor de crecimiento de las larvas sometidas a cierta dosis de toxina. El bioensayo consistió en exponer a las larvas a una dosis alta por cada toxina, ya que el objetivo fue observar si se presentaba o no efecto. Se seleccionaron larvas de 3er instar de la cría y se colocaron en charolas de bioensayo con apartados individuales para evitar canibalismo durante el periodo de ayuno al que fueron sometidas por 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo, todas las larvas fueron pesadas en una balanza analítica para registrar el peso previo al bioensayo. Se procedió a seleccionar las larvas que tuvieran un peso promedio, y evitar variaciones en la respuesta al bioensayo debido a las diferencias de talla. En total se utilizaron 20 larvas de 3er instar por cada toxina más el control (Cry1Ab, Cry1AbMod y control). La solución espora-cristal fue diluida y suspendida en sacarosa al 40% y Tween 20 al 0.02%. En el caso de la Cry1Ab

convencional la dilución quedó a una concentración de  $1.475\mu\text{g}\ \mu\text{L}^{-1}$  y la Cry1AbMod a  $1.41\mu\text{g}\ \mu\text{L}^{-1}$ . Cada una de las larvas se alimentó con  $2\mu\text{L}$  de la disolución para cada una de las toxinas, por lo que cada larva ingirió  $2.95\ \mu\text{g}$  de Cry1Ab y  $2.82\ \mu\text{g}$  de Cry1AbMod. En el caso del control, las larvas se alimentaron de una solución de sacarosa al 20% y Tween 0.02%. Para estimular a la larva a alimentarse de las soluciones, la gota de  $2\ \mu\text{L}$  fue colocada con la micropipeta en papel encerado (Parafilm) y acercando a la larva a la solución, ésta la ingería rápidamente. Después del tratamiento, las larvas fueron colocadas en charolas de bioensayo con apartados individuales con trozos de planta fresca y colocadas en la cámara ambiental durante 72 horas con las condiciones de temperatura y humedad controladas ( $28\pm 2\ ^\circ\text{C}$  y  $70\pm 10\%$  respectivamente).

Cada grupo/tratamiento fue pesado nuevamente con la balanza analítica, y se estimó el factor de crecimiento, que es el cociente del peso final contra el peso inicial.

#### Análisis estadístico

El factor de crecimiento de los tratamientos fue sometido a un análisis de varianza (ANOVA, GraphPad InStat 3). La comparación entre las medias permitió estimar si existió o no una diferencia significativa entre los tratamientos.

#### Bioensayo *T. castaneum*

El bioensayo cualitativo con este insecto se llevó a cabo con larvas de 3er instar. Los individuos se seleccionaron al azar de la cría. El experimento consistió en colocar una dosis alta de cada toxina mezclada con la dieta donde posteriormente se colocaron las larvas. Para preparar los tratamientos, se procedió a pesar  $1.5\text{g}$  de harina de trigo y se mezcló con  $0.5\text{ml}$  de la solución madre de cada una de las dos toxinas. De esta manera el tratamiento de Cry1Ab quedó a una concentración de  $1.474\text{mg}\ \text{g}^{-1}$  y de  $1.41\text{mg}\ \text{g}^{-1}$  para la Cry1AbMod. Una vez mezclada se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente. La mezclanza de la harina y la toxina dio origen a una pasta dura que se molió en un mortero de porcelana hasta hacerla polvo para posteriormente repartirla en tres tubos eppendorf de  $1.5\text{ml}$  ( $0.5\text{g}$  de harina por tubo) para tener tres repeticiones por tratamiento. Se colocaron diez larvas por cada repetición/tratamiento. En el caso de control se utilizó la harina pura. Se colocaron en condiciones de insectario a una

temperatura de  $28\pm 2$  °C, sin fotoperiodo ni humedad relativa controlada por un periodo de cinco días. Pasado el tiempo de bioensayo se observó si las larvas presentaban mortalidad.

## **Bioensayos Lepidópteros**

### ***G. mellonella***

#### Cría de la colonia

La cría de *G. mellonella* se tiene estandarizada en el Insectario del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato. Todos los estadios de desarrollo de este insecto se mantienen a condiciones constantes a una temperatura de  $28\pm 2$  °C, humedad relativa de  $70\pm 10\%$ , y con un fotoperiodo de 16 horas luz. El ciclo de vida es de aproximadamente 25 días bajo estas condiciones. Los insectos adultos se colocan dentro de un contenedor con malla donde las hembras ovipositan sobre toallas de papel, las cuales son retiradas y colocadas en cajas petri de vidrio grandes, donde emergen. Posteriormente se colocan en un frasco de vidrio con capacidad de 3L con dieta a base de cereal y miel estandarizada por el mismo insectario, donde permanecerán hasta la formación de pupas. Las pupas son colocadas nuevamente en el los contenedores con malla donde emergerán los adultos.

#### Bioensayo

Se utilizó un método de bioensayo directo, que consistió en someter a cada una de las larvas a un rango de dosis diferentes de las toxinas. Se seleccionaron larvas de 3er instar y cada una se colocó en vasos individuales de 25mL sin ningún alimento por 72.horas. Una vez transcurrido este tiempo de ayuno, se les sometió al tratamiento. Cada una de las diferentes dosis utilizadas fueron disoluciones de la toxina con sacarosa al 20%. Como control negativo las larvas fueron alimentadas con sacarosa al 20%. Para el caso de las toxinas Cry1Ab y Cry1AbMod se utilizó un rango de cuatro dosis que consistieron en el 50, 25, 12.5 y 6.25% de las disoluciones madre. El tamaño de muestra del experimento fue de 10 larvas por tratamiento/dosis y cada una de ellas fue sometida a 2µL de su tratamiento correspondiente. Como los resultados arrojados fueron cualitativos

de ausencia o presencia de efectos, no fue necesario ningún análisis estadístico adicional para este bioensayo

### ***Spodoptera exigua* Hubner y *Spodoptera frugiperda* Smith**

#### Cría del gusano Soldado y Cogollero

La cría del gusano soldado es proveniente del Laboratorio del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado México. Los insectos en fase larvaria se colocan en vasitos con dieta artificial y se mantienen en una cámara de cría a  $27\pm 1$  °C, humedad relativa de  $70\pm 5\%$  y un fotoperiodo de 14:10 horas luz: oscuridad. Cuando las larvas pasan a la etapa de pupas se lavan para retirarles la dieta. Posteriormente se colocan en bolsas de papel de estraza No. 16. Los adultos se alimentan con miel de abeja al 10%. Las hembras ovipositan por 6 días aproximadamente sobre el papel, y los huevos se recolectan durante este periodo cada 24 horas. Los huevos se mantienen húmedos en la cámara de cría hasta que emergen las larvas neonatas que serán utilizadas en el bioensayo. Para *S. frugiperda*, se utilizaron dos poblaciones completamente diferentes de esta especie. Una de ellas proviene de la cría mantenida por 10 años en Colegio de Postgraduados, esta población no había sido sometida a insecticidas con base en *Bt*, al igual que la segunda población proveniente del Instituto de Biotecnología, UNAM, la cual fue donada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). La cría de *S. frugiperda* es la misma que se describió para *S. exigua*.

#### Bioensayo completo para *S. exigua*

Se utilizó el método de bioensayo descrito por Sims (Sims *et al.*, 1996), que consiste en colocar un mililitro de dieta artificial (TOBACCO BOLLWORM; SOUTHLAND PRODUCTS INC.) en cada cavidad de una charola de bioensayo (BIO-ASSAY TRAY BIO-BA-128; C-D INTERNATIONAL, INC.). Con la dieta ya solidificada se depositó en cada cavidad 100µL de la toxina a la concentración deseada (la toxina se dejó secar completamente por veinticuatro horas antes de infestar). Para obtener dichas concentraciones la toxina se diluyó en agua destilada. Cada disolución fue homogenizada con el agitador magnético. En cada una de las cavidades se colocó una

larva neonata, y se cubrieron con un plástico transparente autoadherible (PULL N´ PEEL TAB BIO-CV-16; C-D INTERNATIONAL, INC.), el cual tiene microperforaciones que permiten la circulación de aire dentro de la cavidad. Las charolas de bioensayo con las larvas fueron colocadas en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura de  $27\pm 1$  °C, humedad relativa  $70\pm 5\%$  y un fotoperiodo de 14 horas luz. A los seis días de haber infestado con larvas de primer instar a la dieta tratada con la concentración deseada de toxina, se evaluaron los siguientes parámetros: a) porcentaje de mortalidad b) porcentaje de reducción de peso respecto al testigo y c) porcentaje de larvas que alcanzaron el tercer instar. Para obtener la línea base mediante el bioensayo completo, se evaluó una amplia gama de concentraciones para la determinación de la ventana biológica donde se encontrarán el cero y el cien por ciento de la respuesta. Posteriormente, para cubrir la gama se incluyeron concentraciones intermedias; en todas se realizaron cuatro repeticiones en diferentes días. El tamaño de la muestra fue de 16 larvas/dosis/repetición y cada repetición incluyó un testigo absoluto al cual solo se le aplicó 100µL de agua destilada. La mortalidad en los tratamientos respecto al testigo se ajustó mediante el empleo de la fórmula de la Mortalidad Corregida de Abbott (Abbott 1925). El nivel máximo de mortalidad aceptable para el testigo absoluto fue de 10%, y el criterio para el establecimiento de un organismo como muerto fue su respuesta a un estímulo físico (si la larva se mueve al ser tocada con un pincel).

#### Bioensayo completo para *S. frugiperda*

En el caso de las dos diferentes poblaciones de gusano cogollero se utilizó un bioensayo similar al del gusano soldado. Se utilizaron charolas de bioensayo individuales de 24 pozos, en cada uno se colocaron 35µL de la concentración correspondiente de la toxina Cry1Ab. Se utilizó una gama de concentraciones de Cry1Ab diluidas en agua destilada (10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 y 5000ng/cm<sup>2</sup>) para cada población evaluada. Una vez seco el pozo se colocó una larva de primer instar. Las charolas se sellaron con papel plástico, el cual permite el paso de oxígeno, y se mantuvieron a temperatura ambiente. A los 7 días se evaluó la mortalidad. El tamaño de la muestra para cada población fue de 24 larvas/dosis y cada repetición incluyó un testigo absoluto al cual solo se le aplicó 35µL de agua destilada. Al igual que con *S. exigua*, la mortalidad en los tratamientos respecto al testigo se ajustó mediante el empleo de la fórmula de la mortalidad corregida de Abbott (Abbott 1925). El nivel máximo de mortalidad aceptable

para el testigo absoluto fue de 10%, y el criterio para el establecimiento de un organismo como muerto fue su respuesta a un estímulo físico (si la larva se mueve al ser tocada con un pincel).

#### Análisis estadístico

El porcentaje de mortalidad, de larvas que alcanzaron el tercer instar y el de reducción de peso respecto al testigo se sometió a un análisis Proc Probit (Raymond, M., 1985) en el paquete estadístico SAS (SAS 2000 System for Windows V8). Cuando los respectivos límites fiduciales al 95% de los resultados obtenidos se traslaparon, no se consideraron significativamente diferentes.

Para todos los bioensayos fue utilizada la misma toxina tanto de Cry1Ab y Cry1AbMod.

## 6. RESULTADOS

---

### Bioensayos Coleópteros

#### *L. texana*

Durante el periodo de 72 horas en el que las larvas se mantuvieron dentro de la cámara ambiental después del tratamiento con las toxinas, se observó un comportamiento normal con respecto al testigo sin tratar. Las larvas se alimentaron regularmente de las hojas de *S. elaeagnifolium*. Cuando se realizó el ANOVA por la prueba de Tukey, el test estimó una ligera diferencia significativa en el factor de crecimiento de los tratamientos con respecto al testigo. De los resultados se puede inferir que las larvas tuvieron una ligera reducción en su peso comparado con el control. La prueba se ajustó a una distribución normal, y con un valor de  $P=0.0079$ . La diferencia que la prueba ANOVA estimó es tan pequeña que en términos biológicos no es significativa, y mucho menos a una concentración tan alta como a la que fueron sometidas las larvas de este insecto. Los insectos ingirieron 2.95  $\mu\text{g}$  de Cry1Ab y 2.82  $\mu\text{g}$  de Cry1AbMod, concentraciones muy altas, y ninguna de las dos toxinas tuvo efectos biológicamente significativos en el coleóptero. Las larvas siguieron bajo observación hasta completar su desarrollo a la etapa adulta, a la cual llegaron sin problemas.

#### Bioensayo *T. castaneum*

Después de los seis días en la cámara de insectario, las larvas de *T. castaneum* se observaron sin ninguna alteración con respecto al testigo. En cada tratamiento/repeticón se observó un cero por ciento de mortalidad. A pesar de que las larvas fueron sometidas a una alta concentración de toxina, ésta no tuvo efecto alguno observable.

## Bioensayos Lepidópteros

### *G. mellonella*

A pesar de que las larvas de este lepidóptero fueron alimentadas directamente con la toxina, llegando a ser la más alta de casi 3 µg, éstas no presentaron mortalidad ni efectos adversos observables en su desarrollo con respecto al testigo sin tratar. Tanto la Cry1Ab como la Cry1AbMod fueron incapaces de causar efecto alguno observable en la población de *G. mellonella*.

### *S. exigua*

Para el caso del gusano soldado (*S. exigua*) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la toxicidad de la Cry1Ab y la Cry1AbMod. En todos los parámetros evaluados los valores obtenidos tanto de LC<sub>50</sub> como de LC<sub>95</sub> en ambas toxinas no difieren al mantenerse uno a otro dentro de los límites fiduciales calculados (Tabla 5). Dado lo observado en laboratorio y lo arrojado por la prueba probit, se puede concluir que no existe evidencia sólida para argumentar que las proteínas evaluadas tienen una toxicidad diferente real. Tanto la Cry1Ab y la Cry1AbMod mostrando altos niveles de toxicidad para esta población de gusano soldado, a diferencia de lo documentado por otros autores.

Para fines agronómicos y de control de plagas, los valores más significativos son los niveles de toxicidad tomando en cuenta los resultados obtenidos para LC<sub>95</sub>. Considerando este nivel de respuesta (el 95% de los individuos tratados), tanto la toxina Cry1Ab como la Cry1AbMod son igualmente efectivas contra el gusano soldado.

Las concentraciones de toxina necesaria para provocar alteraciones en el desarrollo son mucho menores que las necesarias para provocar la muerte de la larva (Tabla 5). Un parámetro útil para estimar las afectaciones en el desarrollo de las larvas es observando cuántas de éstas llegaron a un tercer instar sano después del tratamiento. Algunos autores consideran que una vez que la larva alcanzó el tercer instar en su desarrollo, la larva tiene más probabilidad de sobrevivir pese a que fue expuesta a un agente tóxico. Si bien este parámetro ayuda a la interpretación de los datos, existen otras

variables que se deben considerar, como el tiempo transcurrido en la medición de los resultados y las propias de la técnica del bioensayo utilizado.

En el laboratorio se observó que el principal efecto de las toxinas fue la de reducción de peso en las larvas respecto al testigo sin tratar, afectando a la gran mayoría de los individuos expuestos. La reducción en peso y talla fue directamente proporcional a la concentración de toxina. Las larvas sometidas a las dosis más altas morían, ó presentaban una reducción mayor del 90% de su peso y talla con respecto del testigo sin tratar. A pesar de ello, algunas larvas en estas condiciones sobrevivían y lograban completar su desarrollo hasta la etapa adulta si ya no eran expuestas a la toxina. Este tipo de observaciones son muy importantes al analizar el comportamiento de estas toxinas en el campo. A pesar de que se habla de resistencia en campo, es muy poco probable que tengan un adecuación al medio que les permita sobrevivir, además de estar expuestos permanentemente a la toxina, lo cual disminuye aun más la probabilidad inicial.

**Tabla 5.** Análisis probit sobre la mortalidad, pérdida de peso e inhibición del desarrollo en *S. exigua* por el efecto de la toxina Cry1Ab y Cry1AbMod.

ESPECIE	PARÁMETRO	TOXINA	n <sup>a</sup>	PENDIENTE (± ES <sup>b</sup> )	DE <sub>50</sub> * ng cm <sup>-2</sup> (95% LC <sub>50</sub> )	DE <sub>95</sub> * ng cm <sup>-2</sup> (95% LC <sub>95</sub> )	P > χ <sup>2</sup>	TR <sub>50</sub> <sup>▫</sup>	TR <sub>90</sub> <sup>▫</sup>
<i>S. exigua</i>	Mortalidad	Cry1Ab	448	1.2 ± 0.09	28 (21.8-38.3)	663 (402-1,275)	<.0001	1.9	3.3
		Cry1AbMod	448	0.9 ± 0.08	51 (37-71)	2256 (1184-5382)	<.0001	1	1
	Pérdida de peso	Cry1Ab	448	1.2 ± 0.08	2.8 (2.2-3.6)	67 (45-109)	<.0001	1	2.4
		Cry1AbMod	448	0.95±0.071	3 (2-4)	165 (104-297)	<.0001	1	1
	Larvas 3er instar	Cry1Ab	448	1.35 ± 0.1	8 (6 -11)	148 (92-277)	<.0001	1.9	1.5
		Cry1AbMod	448	1.42±0.1	15 (11-19)	215 (143-366)	<.0001	1	1

\* Dosis Estimada al respectivo 50% y 95 % para:

CL<sub>50</sub>, concentración a la cual muere el 50% de la población evaluada.

IP<sub>50</sub>, concentración a la cual el 50% de los organismos evaluados se ven afectados en su peso.

ID<sub>50</sub>, concentración a la cual el 50% de los organismos evaluados no llegaron al 3er instar sano.

CL<sub>95</sub>, concentración a la cual muere el 95% de la población evaluada.

IP<sub>95</sub>, concentración a la cual el 95% de los organismos evaluados se ven afectados en su peso.

ID<sub>95</sub>, concentración a la cual el 95% de los organismos evaluados no llegaron al 3er instar sano.

▫ Toxicidad Relativa = DE<sub>50 (95)</sub> más alto observado con la toxina 1/ CL<sub>50 (95)</sub> respectivo con la toxina 2.

## *S. frugiperda*

Como se puede observar en la Tabla 6 la población proveniente del IBT no mostró susceptibilidad alguna a la toxina Cry1Ab. Los valores de LC<sub>50</sub> son tan altos, que en términos de su viabilidad para aplicarlo como insecticida para esta población de cogollero sería inútil. Dentro de sus bajos niveles de susceptibilidad es importante notar que existen diferencias claras en ambas poblaciones, siendo la proveniente del CP la que obtuvo niveles menores comparados con los vistos con la población del IBT. En términos de susceptibilidad, estos datos nos hablan de que existe una variabilidad intraespecífica en la respuesta dentro de la misma especie de *S. frugiperda* para la toxina Cry1Ab. Para un estudio subsecuente valdría la pena analizar el comportamiento de estas poblaciones y otras al ser sometidos a la toxina Cry1AbMod, pero por lo hasta ahora observado, probablemente no existan diferencias significativas.

**Tabla 6.** Análisis probit sobre la mortalidad, en *S. frugiperda* por el efecto de la toxina Cry1Ab de las poblaciones del Instituto de Biotecnología, UNAM, y del Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

* Población	TOXINA	n <sup>a</sup>	PENDIENTE (± ES <sup>b</sup> )	DE <sub>50</sub> * ng cm <sup>-2</sup> (95% LC <sub>50</sub> <sup>d</sup> )	P > χ <sup>2</sup>	TR <sub>50</sub> <sup>a</sup>
IBT	Cry1Ab	408	0.4 ± 0.12	837101 (52838- 22284232)	<.000 1	1
CP	Cry1Ab	408	0.97 ± 0.21	3944 (2293-9251)	<.000 1	212

\*Dosis Estimada al respectivo 50% para

<sup>d</sup> LC<sub>50</sub>, concentración a la cual muere el 50% de la población evaluada.

Toxicidad Relativa = DE<sub>50</sub> más alto observado con la toxina 1/ CL<sub>50</sub> respectivo con la toxina 2.  
IBT. Instituto de Biotecnología. UNAM

## 7. DISCUSIÓN

---

La proteína Cry1AbMod es una toxina nueva con alto potencial de empleo para el control de insectos plaga. El evaluar si presenta cambios en su espectro de acción entre los diferentes órdenes de insectos es necesario para conocer las consecuencias de su modificación directamente en bioensayos con insectos. Mientras el modo de acción de las toxinas Cry no se conozca a detalle para todos los insectos y para todas las toxinas, es importante observar su toxicidad de forma directa, además de que el uso del bioensayo es una herramienta muy útil para establecer su efectividad y predecir su desempeño en campo.

### **Respuesta a las toxinas Cry1Ab y Cry1AbMod en los Coleópteros evaluados**

De las pocas toxinas Cry evaluadas para el control de plagas del Orden Coleóptera, la más efectiva es la Cry3Aa (van Frankenhuyzen 2009). En el caso de la Cry1Ab, aunque se creía que los efectos en coleópteros serían marginales, no se habían reportado datos precisos con bioensayos *in vivo* para sustentar esta hipótesis. Los coleópteros evaluados en este trabajo (*L. texana* y *T. castaneum*) no presentaron mayores afectaciones por parte de una dosis diagnóstica de ninguna de las toxinas evaluadas. La toxina Cry1Ab se ha documentado extensamente como tóxica para insectos del orden Lepidóptera. Estudios en el modo de acción de las toxinas Cry en coleópteros mencionan que lo más probable es que la toxina Cry1Ab no pueda ser reconocida por las proteasas naturales de los coleópteros, ya que se ha observado que existe un sitio de reconocimiento de la proteasa quimotripsina/catepsina G en el dominio I de la Cry3A, lo cual le permite ser activada e intoxicar a coleópteros (Walters *et al.*, 2008). En el Orden Coleóptera se ha documentado la presencia de receptores específicos para las toxinas Cry, y se sabe que la toxina Cry1Ab no puede unirse a la membrana del epitelio intestinal de estos insectos (Bravo *et al.*, 1992). La toxina Cry1AbMod tampoco mostró tener ningún efecto en *L. texana* y *T. castaneum*, por lo que su diferencia a nivel molecular en el Dominio I con respecto a la Cry1Ab convencional no es la indicada para extender su espectro de acción en este Orden de insectos. Otro dato importante es que el pH ácido que presenta el intestino de coleópteros puede impedir la solubilización y subsecuente activación de la toxina Cry1Ab que normalmente si pasa a pH alcalino, como

se presenta en lepidópteros (De Maagd *et al.*, 2001). Por lo tanto la Cry1AbMod no ve afectado su espectro de acción en coleópteros, y sigue presentando las mismas limitantes que la Cry1Ab convencional para ser tóxica en este orden de insectos, que son la ausencia de condiciones adecuadas para su activación y de receptores específicos de unión.

### **Susceptibilidad de los lepidópteros evaluados con la Cry1Ab y Cry1AbMod**

Uno de los insectos lepidópteros más complejos en su respuesta a toxinas Cry es *G. mellonella*. Hacia la tercera parte del siglo pasado existieron algunos estudios que analizaban la posibilidad de emplear a *B. thuringiensis* para el control de esta plaga que afecta severamente a los apicultores al causar daños importantes en sus panales de abeja (Burgess y Bailey 1968; Vankova *et al.*, 1974; Bosgelmez *et al.*, 1983). *B. thuringiensis var galleriae* o mejor conocido en aquellos tiempos como “serotipo V” era la más efectiva para el control de esta plaga (Burgess y Bailey 1968), sin embargo mostraba una toxicidad marginal para otras plagas de mayor interés por lo que se dejó de comercializar, además de que presentaba algunos problemas técnicos en su empleo para combatir a la plaga (Burgess 1978). Actualmente se sigue considerando a la cepa de *B. thuringiensis var galleriae* como efectiva contra este lepidóptero, sin embargo se ha observado que *G. mellonella* tiene un armamento inmunológico bioquímico que atenúa la infección cuando la concentración de espora-cristal es insuficiente y que resultan como catalizadores de la toxicidad a concentraciones altas (Dubovskiy *et al.*, 2008). En el presente trabajo tanto la Cry1Ab como la Cry1AbMod no presentaron actividad en contra de *G. mellonella* aun cuando la concentración más alta fue de 2.8µg. En el caso de la cepa documentada como activa contra esta plaga se tendría que investigar cuáles son las toxinas que presentan actividad contra el insecto, aunque algunos reportes mencionan que adicional a la toxina Cry existen otras moléculas secretadas por la bacteria como la metaloproteasa de zinc (InhA) que complementan la toxicidad de *B. thuringiensis* para *G. mellonella* (Fedhila *et al.*, 2002). A pesar de que la polilla de la cera *G. mellonella* pertenece al Orden Lepidoptera y que las toxinas Cry1A son ampliamente conocidas por su actividad en estos insectos, ni la Cry1Ab y la Cry1AbMod mostraron actividad alguna, lo cual indica que cada insecto tiene una respuesta diferencial a las toxinas Cry dependiendo de factores tales como la presencia de receptores específicos, la edad de las larvas, ya que larvas más jóvenes son en general más susceptibles (Bosgelmez *et al.*,

1983), la solubilización de las toxinas y en algunos casos la presencia de moléculas complementarias que potencian la actividad tóxica.

### **Consecuencias de la variación genética entre las poblaciones de lepidópteros en sus niveles de susceptibilidad a las toxinas Cry.**

Estudios previos documentaron que la toxina Cry1Ab carece de actividad tóxica en el gusano soldado *S. exigua* (Luttrell *et al.*, 1999; MacIntosh *et al.*, 1990; Moar *et al.*, 1990; Visser *et al.*, 1990), sin embargo, otros autores encontraron una toxicidad que van de niveles moderados a altos dependiendo de la población evaluada (Chambers *et al.*, 1991; de Maagd *et al.*, 2000; Hernández-Martínez *et al.*, 2008). Estos datos respaldan el hecho de que algunas plagas de insectos aún siendo de la misma especie, presentan niveles de respuesta variables para un mismo agente tóxico, en este caso en específico hacia las toxinas Cry evaluadas. Otros autores han documentado esta variabilidad intraespecífica en diversas especies (Monnerat *et. al.* 2006; Hernández-Martínez *et al.*, 2008).

En este trabajo se observó una alta actividad tanto de la Cry1Ab como de la Cry1AbMod en la población de gusano soldado evaluada. Algunas evaluaciones llevadas a cabo en las mismas condiciones en poblaciones diferentes afirman que la variabilidad genética es causa importante del espectro de respuesta observado (Hernández-Martínez *et al.*, 2008). Es precisamente en la variabilidad genética de poblaciones de insectos en donde podemos basar los niveles de respuesta encontrados en las poblaciones evaluadas en el presente trabajo. Nuestra población de *S. exigua* es altamente susceptible a las toxinas Cry1Ab y Cry1AbMod. A pesar de la diferencia a nivel molecular existente entre estas toxinas, la población de gusano soldado expuesta a ellas no presentó diferencias significativas al traslaparse los límites al 95% de confiabilidad de los valores obtenidos para LC<sub>50</sub> y LC<sub>95</sub>.

Al igual que *S. exigua*, en el gusano cogollero *S. frugiperda* se han documentando diferencias en sus niveles de susceptibilidad a numerosas toxinas Cry debido a la variabilidad genética presente entre poblaciones de diferentes regiones geográficas (Monnerat, R. *et. al.* 2006). La variabilidad de respuesta observada puede explicarse debido a las diferencias genéticas adquiridas a lo largo de procesos evolutivos alopátricos. Los resultados aquí obtenidos refuerzan este argumento. Si bien ninguna de

las poblaciones evaluadas presento altos niveles de susceptibilidad a la Cry1Ab, dentro de sus bajos valores de respuesta se encontraron diferencias estadísticamente significativas que pueden estar ligadas directamente a la variabilidad genética presente en cada población. La población proveniente del Colegio de Postgraduados campus Montecillo presentó valores LC<sub>50</sub> mucho más bajos para la Cry1Ab que aquellos observados con la población proveniente del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **El papel de los receptores en la especificidad de las toxinas Cry**

A diferencia de *G. mellonella*, en *S. frugiperda* se ha podido predecir la presencia del receptor caderina por medio de los bancos de genes disponibles (Piggot y Ellar 2007), y aunque no se ha comprobado su intervención en el modo de acción de las toxinas Cry en la especie, es muy probable lo haga ya que se ha visto que la esta toxina puede unirse sus membranas celulares del epitelio intestinal (Luo *et al.*, 1999). Sin embargo, diversos autores han documentado algunos casos dónde aún con la unión de la toxina Cry al epitelio intestinal, el insecto no presenta susceptibilidad (Liang *et al.*, 1995). Por lo tanto la unión a la membrana no es garantía de toxicidad y su evaluación por bioensayos es crucial.

El mecanismo de acción de la toxina Cry1AbMod ha sido caracterizado recientemente (Muñoz-Garay *et al.*, 2009). La toxina modificada tiene un mecanismo similar al de la toxina convencional, excepto la unión al receptor caderina. Esta proteína al no requerir de la unión al receptor primario, puede formar oligómero al ser activado por las proteasas y unir con receptores secundarios para posteriormente formar poros en la membrana y la subsecuente muerte del insecto. Si bien la toxina Cry1Ab no presentó altos niveles de toxicidad en el gusano cogollero, la diferencia observada entre las poblaciones es evidente (Tabla 6). La variabilidad genética así como la afinidad de los receptores membranales al ligando (en este caso la toxina) puede explicar los niveles de susceptibilidad relativos. Sería interesante hacer evaluaciones futuras con *S. frugiperda* empleando la toxina Cry1AbMod, sin embargo con lo hasta ahora observado es poco probable que existan diferencias en su toxicidad más allá a las observadas con la Cry1Ab.

El presente trabajo es una prueba de la especificad que las toxinas Cry presentan en su espectro de acción. Como se ha observado en el estudio en su mecanismo de

acción en los diferentes órdenes de insectos, existen ciertas limitantes que les impiden ser generalistas. Esto indica que el actual uso de las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* tiene muchas ventajas con respecto a medidas de bioseguridad, al ser inerte para organismos no blanco como completamente biodegradable (Kumar *et al.*, 2008). Aunque en algunos casos se ha visto toxicidad por algunas proteínas Cry entre órdenes de insectos, esto no amenaza la seguridad en su empleo, ya que los niveles de susceptibilidad en insectos no blanco (cuando los presentan) es muy bajo (van-Frankenhuyzen 2009).

En el caso específico de la toxina Cry1AbMod, se comprobó que la modificación que presenta no es suficiente para atacar insectos como los coleópteros probados en este estudio. La ausencia de la hélice  $\alpha$ -1 del extremo terminal N, no desencadena una alteración significativa en la acción insecticida de esta proteína, ó si sucede, no es cualitativamente percibido en la toxicidad contra estos insectos por medio de un bioensayo. Estadísticamente el comportamiento de la variedad silvestre y la modificada fue igual en el caso de los organismos evaluados de este orden. El espectro de acción de la Cry1AbMod no se ve alterado. Es importante destacar el papel que juegan los receptores secundarios como la Aminopeptidasa N y Alcalino Fosfatasa en la especificidad. Si bien la unión de la proteína Cry al receptor caderina se vuelve un paso prescindible para la Cry1AbMod, la interacción con los receptores secundarios se convierte en una etapa crucial en la especificidad de la acción tóxica de estas proteínas. Anteriormente se pensaba que la unión al receptor caderina era fundamental en la especificidad de las toxinas Cry, al estar ausente en algunas poblaciones de insectos resistentes.

### **Evaluación y monitoreo de la susceptibilidad de insectos a las toxinas Cry.**

Para fines agronómicos, tomar en cuenta los valores obtenidos por los ED<sub>95</sub> son determinantes para la toma de decisiones en el control de plagas. En laboratorio se observó la respuesta de las larvas de *S. exigua* desde tres puntos de vista: la mortalidad, la pérdida de peso, y la etapa de tercer instar sano. El evaluar estos tres parámetros nos permite observar de una manera más completa los efectos de las toxinas en las larvas.

Aunque la respuesta de mortalidad es la más esperada en campo, una importante reducción de peso en las larvas limita mucho su adecuación al ambiente, y por consecuencia su nivel de sobrevivencia al encontrarse en condiciones hostiles como temperatura variable, depredadores, parasitoides y respuestas químicas de defensa por parte de la planta (Hernández-Martínez *et al.*, 2008). Una larva que disminuya su peso en un 90% es poco probable que sobreviva bajo estas condiciones, por lo que estimar las concentraciones que logran esta respuesta puede ser útil para conocer su posible comportamiento en campo. En este caso, las toxinas Cry1Ab y Cry1AbMod muestran una inhibición de desarrollo importante en las larvas de Lepidópteros evaluadas, por lo que debe ser tomado en cuenta como uno de los efectos principales de las toxinas Cry. Cabe mencionar que no todas las toxinas matan con reducción de peso (Hernández-Martínez *et al.*, 2008), por lo que evaluar este parámetro depende del efecto de la toxina en el insecto.

Los insectos resistentes son los que desarrollan menor susceptibilidad a las toxinas Cry (Tabashnik *et al.*, 2009) de la que tenían inicialmente. Sin embargo el costo de ser resistente es muy alto (Gassman *et al.*, 2009), y puede tener efectos en su adecuación al medio ambiente. La reducción de peso, puede ser considerado como un fenotipo que pueden presentar los insectos resistentes, sin embargo también tienen desventajas claras al desenvolverse en un ambiente hostil como el presente en los campos de cultivo.

#### **Uso de la toxina Cry1AbMod para el control de insectos plaga y como estrategia de control del desarrollo de resistencia.**

Actualmente la principal estrategia de manejo de resistencia es el empleo de refugios libres de plantas *Bt* que van del 5 al 20% del total de área cultivada (Tabashnik *et al.*, 2008). Ésta requiere el cultivo de la variedad no transgénica, para mantener las poblaciones de insectos susceptibles, coadyuvando al libre entrecruzamiento de insectos resistentes (recesivos) y susceptibles (dominantes). Sin embargo estudios recientes han demostrado que para algunas plagas, el movimiento entre las plantas de las larvas puede hacer menos eficiente esta estrategia (Bates *et al.*, 2005). Por ello es necesario implementar otras medidas de control y prevención de la resistencia de insectos a los bioinsecticida con base en *Bt*. La inclusión de las plantas *Bt* al Manejo Integrado de Plagas ha sido un propuesta que en muchos casos ha sido fructífera (Kos *et al.*, 2009).

En este sentido, la implementación de insecticidas con base en Cry1AbMod para el control de algunos lepidópteros puede ser una estrategia exitosa, ya que la mayoría de los eventos de resistencia conocidos involucran mutaciones en el gen de caderina, receptor que esta nueva toxina no requiere para provocar la muerte del insecto.

Muchos creen que con el solo hecho de plantar cultivos *Bt* no es necesario un seguimiento, evaluación e implementación de otras medias de control. Sin embargo, para poder mantener esta tecnología es necesario de otros métodos que deben ir de la mano de los cultivos *Bt* como el empleo de cultivos GM con altos niveles de expresión de toxina, expresión simultánea de varios genes *Bt* (eventos piramidales), control biológico con depredadores naturales y ahora las toxinas modificadas como la Cry1AbMod (Bravo y Soberón 2008, Kos et al., 2009).

Detallar el conocimiento en el mecanismo de acción de acción de las toxinas Cry permitirá mejorar el control biológico que hasta el momento ha sido exitoso con el uso de *B. thuringiensis*, El diseño de toxinas con características novedosas como la Cry1AbMod capaz de actuar contra insectos resistentes (Soberón *et al.* 2007) son el tipo de alternativas que se debe desarrollar para su uso en el futuro del control de plagas en la agricultura.

Por años la estrategia de control de plagas en los cultivos a nivel mundial ha sido el uso de insecticidas químicos (Kirsi-marja *et al.*, 2002). Los efectos adversos en el ambiente y en la salud humana, así como bajas en su rentabilidad por el desarrollo de resistencia por parte los insectos ha obligado la búsqueda de nuevas alternativas eficaces y amigables con el medio ambiente. La historia se repite con el uso de toxinas Cry en los cultivos *Bt*.

### **Estudios de evolución de resistencia in vitro y búsqueda de nuevas toxinas con potencial insecticida**

En estudios futuros sería interesante comparar la acción conjunta de Cry1Ab y Cry1AbMod con aquella presentada de manera individual por cada toxina. Esto tendría impactos positivos en el campo, y con insectos que han desarrollado resistencia por medio de mutaciones en el gen de caderina. Al igual, es necesario investigar en

condiciones de laboratorio el probable desarrollo de resistencia de insectos a la toxina Cry1AbMod, por medio de selección artificial, y evaluar qué tipo de mecanismos podrían utilizar los insectos para evadir la toxicidad de esta nueva toxina. Adelantarnos a lo que podría pasar en campo es una ventaja que tenemos para prevenir y asegurar el control de plagas.

Hasta el momento, más de 124 holotipos de toxinas Cry de 174 documentadas han sido probadas en una cantidad muy pequeña de órdenes de insectos (van-Frankenhuyzen 2009), por lo que los recursos disponibles de toxinas Cry es inmenso, y es necesario más investigación sobre sus espectros de acción y evitar la dependencia de unos cuantos tipos de toxinas Cry empleadas en la actualidad. Otro aspecto importante en considerar es la variación intraespecífica presente en la respuesta a las toxinas Cry. Esto es una razón de peso para evaluar y utilizar las toxinas de *Bt* en concordancia con las especies de insectos plaga presentes en determinada región geográfica. La introducción de cultivos *Bt* debe estar respaldada por estudios de susceptibilidad de las poblaciones de insectos plaga locales, y garantizar su efectividad antes de su liberación al campo.

El perfeccionamiento del conocimiento en el modo de acción de las toxinas Cry en las diferentes especies, así como en el grado de variabilidad genética (como sus consecuencias en su respuesta) contribuye al correcto manejo y monitoreo de estos insecticidas en el campo ya sea en cultivos *Bt* o como bioinsecticidas en formulaciones de aspersión.

## 8. CONCLUSIONES

---

El espectro de acción de la toxina Cry1AbMod no fue modificado con respecto a la toxina Cry1Ab convencional en los organismos analizados en este estudio, sin embargo tiene un gran potencial al poseer una gran actividad en contra insectos resistentes derivados de mutaciones en el gen caderina por lo que su subsecuente liberación en campo puede mejorar el desempeño de este insecticida con plagas que hasta el momento la toxina convencional tiene niveles de respuesta moderados.

El uso de la toxina Cry1Ab en conjunto con la Cry1AbMod en campo podría ser utilizado para mejorar el control integrado de plagas y el manejo de resistencia, ya que los organismos que lleguen a desarrollar cierta tolerancia a la Cry1Ab pueden ser eliminados con la Cry1AbMod, previniendo y aplazando la evolución de resistencia a estas toxinas al ser las mutaciones en el gen de caderina el modo más común de resistencia.

La variabilidad genética generada por procesos evolutivos alopátricos debido al cultivo de plantas de interés agronómico en diferentes latitudes donde las mismas plagas coevolucionan con su hospedero, debe ser evaluada antes del uso o introducción de cultivos GM que expresen toxinas Cry para comprobar su efectividad con las poblaciones de insectos plaga locales y su inocuidad en organismos no blanco.

El efecto que las toxinas Cry tiene sobre el desarrollo y peso de los insectos es una característica importante a evaluar, al ser ésta una característica que muchas de las toxinas Cry provocan y que en campo tiene consecuencias deseadas contra las plagas.

Evaluar en condiciones de laboratorio los probables mecanismos de evasión a la toxicidad de la Cry1AbMod por medio de selección artificial de poblaciones resistentes es una tarea importante para continuar con el estudio y prevención de la evolución de resistencia de los insectos a toxinas Cry.

Es necesario caracterizar el mecanismo de acción de las toxinas Cry en insectos de importancia agronómica, así como explorar la diversidad de toxinas Cry disponibles y hasta el momento no evaluadas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

Abbott, W.S., A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. J Am Mosq Control Assoc, 1987. 3(2): p. 302-3.

Aguilar-Medel, S., Rodríguez-Maciel, JC., Díaz-Gómez, O., Martínez-Carrillo, JL., López-Collado, J., Blanco, CA., y Lagunes-Tejeda, A, Susceptibilidad de *Helicoverpa zea* (Boddie) a la  $\delta$  endotoxina Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* BERLINER. *Agrociencia*, 2007. 41(6): p. 653-662.

Aimanova, K.G., M. Zhuang, and S.S. Gill, Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. *J Invertebr Pathol*, 2006. 92(3): p. 178-87.

Andrews, K.L., Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera :Noctuidae). *Florida Entomologist*, 1988. 71(4): p. 630-653.

Angelini, D.R. and E.L. Jockusch, Relationships among pest flour beetles of the genus *Tribolium* (Tenebrionidae) inferred from multiple molecular markers. *Mol Phylogenet Evol*, 2008. 46(1): p. 127-41.

Angst, B.D., C. Marcozzi, and A.I. Magee, The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 4): p. 629-41.

Anilkumar, K.J., et al., Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). *Appl Environ Microbiol*, 2008. 74(2): p. 462-9.

Bates, S.L., et al., Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat Biotechnol*, 2005. 23(1): p. 57-62.

Blanco, C.A., *Cultivos transgénicos para la agricultura latinoamericana*, ed. S. FCE, CONACyT. 2008, México. 168.

Bosgelmez, A., et al., [The effects of *Bacillus thuringiensis* on the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Galleriidae)]. *Mikrobiyol Bul*, 1983. 17(4): p. 233-42.

Bottrell, D.G. and P.L. Adkisson, Cotton insect pest management. *Annu Rev Entomol*, 1977. 22: p. 451-481.

Bravo, A., S.S. Gill, and M. Soberon, Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 2007. 49(4): p. 423-35.

Bravo, A., S.S. Gill, and M. Soberón, *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use, in *Comprehensive Molecular Insect Science*. 2005, Elsevier BV: Amsterdam.

Bravo, A., et al., Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1667(1): p. 38-46.

Bravo, A., et al., Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J Invertebr Pathol*, 1992. 60: p. 247–254.

Bravo, A., S. Jansens, and M. Peferoen, Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J Invertebr Pathol*, 1992. 60: p. 237–246.

Bravo, A., et al., Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1562(1-2): p. 63-9.

Bravo, A. and M. Soberon, How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol*, 2008. 26(10): p. 573-9.

Burges, H.D., Control of wax moths: Physical, chemical and biological methods. *Bee-World*, 1978. 59: p. 129–138.

Burges, H.D. and L. Bailey, Control of the greater and lesser wax moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*, 1968. 11(2): p. 184-95.

Burges, H.D. and E.M. Thomson, Standardization and Assay of Microbial Insecticides, in *Control of Insects*, H.D. Burges and N.W. Hussey, Editors. 1971, Academic Press: New York. p. 861.

Burton, S.L., et al., 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*, 1999. 287(5): p. 1011-22.

Caccia, S., et al., Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. *PLoS One*, 2010. 5(4): p. e9975.

Carpenter, J., et al., Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional Soybean, Corn, and Cotton Crops. 2002: Council for Agricultural Science and Technology.

Carroll, J., et al., Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J Invertebr Pathol*, 1997. 70(1): p. 41-9.

CERA. GM Crop Database. 2010 [cited 2010; Available from: [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database).

Chambers, J.A., et al., Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *J Bacteriol*, 1991. 173(13): p. 3966-76.

Chen, J., et al., Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res*, 2005. 321(1): p. 123-9.

ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. 2010.

Crespo, A.L., et al., 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*, 2009. 65(10): p. 1071-81.

Crickmore, N., et al., Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. 62(3): p. 807-13.

Cuda, J.P., et al., Evaluation of exotic *Solanum* spp. (Solanales: Solanaceae) in Florida as host plants for the leaf beetles *Leptinotarsa defecta* and *L. texana*

(Coleoptera: Chrysomelidae). *Florida Entomologist*, 2002. 85(4): p. 599-610.

Dale, P.J., B. Clarke, and E.M. Fontes, Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nat Biotechnol*, 2002. 20(6): p. 567-74.

De León, T. and J.E. Ibarra, Alternative Bioassay technique to measure activity of CryIII proteins of *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol*, 1995. 88(6): p. 1596-1601.

de Maagd, R.A., et al., 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*, 1999. 31(2): p. 463-71.

de Maagd, R.A., et al., Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*, 2003. 37: p. 409-33.

de Maagd, R.A., A. Bravo, and N. Crickmore, How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*, 2001. 17(4): p. 193-9.

de Maagd, R.A., et al., *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*, 2000. 66(4): p. 1559-63.

Dell'Orto, H.T., *Insectos que dañan granos productos almacenados*. 1985, Santiago, Chile: OFICINA REGIONAL DE LA FAO PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE. 142.

Dorsch, J.A., et al., 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*, 2002. 32(9): p. 1025-36.

Duncan, F.D., The role of the subelytral cavity in respiration in a tenebrionid beetle, *Onymacris multistriata* (Tenebrionidae: Adesmiini). *J Insect Physiol*, 2003. 49(4): p. 339-46.

E.P.A., U.S., FIFRA Scientific Advisory Panel, Subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant Pesticides and Resistance Management. , in Environmental Protection Agency. 1998. p. 9-10.

Fabrick, J.A., L. Forlow Jech, and T.J. Henneberry, Novel pink bollworm resistance to the Bt toxin Cry 1Ac: effects on mating, oviposition, larval development and survival. *J Insect Sci*, 2009. 9: p. 24.

Federici, B.A., Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J Invertebr Pathol*, 2005. 89(1): p. 30-8.

Fedhila, S., P. Nel, and D. Lereclus, The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *J Bacteriol*, 2002. 184(12): p. 3296-304.

Ferre, J. and J. Van Rie, Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, 2002. 47: p. 501-33.

Flanagan, R.D., et al., Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem Mol Biol*, 2005. 35(1): p. 33-40.

Forcada, C., et al., Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. 1996. p. 257-272.

Franklin, M.T., et al., Modified *Bacillus thuringiensis* toxins and a hybrid *B. thuringiensis* strain counter greenhouse-selected resistance in *Trichoplusia ni*. *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75(17): p. 5739-41.

Gahan, L.J., F. Gould, and D.G. Heckel, Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 2001. 293(5531): p. 857-60.

Georghiou, G.P. and C.E. Taylor, Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J Econ Entomol*, 1977. 70(3): p. 319-23.

Gomez, I., et al., Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J Biol Chem*, 2006. 281(45): p. 34032-9.

Gomez, I., et al., Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. *Biochemistry*, 2003. 42(35): p. 10482-9.

Gomez, I., et al., Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope (869)HITDTNKK(876) in *Manduca sexta* Bt-R(1) receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J Biol Chem*, 2002. 277(33): p. 30137-43.

Gomez, I., et al., Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J Biol Chem*, 2001. 276(31): p. 28906-12.

Gomez, I., et al., Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 2007. 28(1): p. 169-73.

Gomez, I., et al., 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*, 2002. 513(2-3): p. 242-6.

Gould, F., Potential and problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. *Biocontrol Science and Technology*, 1994. 4(4): p. 451 - 461.

Griffitts, J.S. and R.V. Aroian, Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays*, 2005. 27(6): p. 614-24.

Gunning, R.V., et al., New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl Environ Microbiol*, 2005. 71(5): p. 2558-63.

Hara, H., et al., 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*, 2003. 538(1-3): p. 29-34.

Helgason, E., et al., *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66(6): p. 2627-30.

Hernandez-Martinez, P., J. Ferre, and B. Escriche, Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*, 2008. 97(3): p. 245-50.

Herrero, S., et al., *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*, 2005. 6: p. 96.

Hofmann, C., et al., 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*, 1988. 85(21): p. 7844-8.

Hua, G., J.L. Jurat-Fuentes, and M.J. Adang, Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R(1a) cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004. 34(3): p. 193-202.

Hua, G., et al., Anopheles gambiae cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of Bacillus thuringiensis israelensis and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. Biochemistry, 2008. 47(18): p. 5101-10.

Jacques JR., R.L., The potato beetles: The genus Leptinotarsa in North America (Coleoptera: Chrysomelidae). Flora & Fauna Handbook, ed. E.J. Brill. 1988, New York.: E. J. Brill.

James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009, B.N. 37, Editor. 2009, ISAAA: Ithaca, NY.

Jimenez-Juarez, N., et al., The pre-pore from Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in Manduca sexta. Peptides, 2008. 29(2): p. 318-23.

Jimenez-Juarez, N., et al., Bacillus thuringiensis Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to Manduca sexta larvae. J Biol Chem, 2007. 282(29): p. 21222-9.

Jin, N., et al., Differential expression of GABAA receptor pi subunit in cultured rat alveolar epithelial cells. Cell Tissue Res, 2005. 321(2): p. 173-83.

Jurat-Fuentes, J.L. and M.J. Adang, Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae. Eur J Biochem, 2004. 271(15): p. 3127-35.

Keeton, T.P. and L.A. Bulla, Jr., 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, 1997. 63(9): p. 3419-25.

Kirsi-marja, O.C. and H.B. Wolfgang, Plant Biotechnology and transgenic plants. 2002, New York: Macel Dekker. 683.

Knight, P.J., N. Crickmore, and D.J. Ellar, The receptor for Bacillus thuringiensis CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran Manduca sexta is aminopeptidase N. Mol Microbiol, 1994. 11(3): p. 429-36.

Koller, C.N., L.S. Bauer, and R.M. Hollingworth, Characterization of the pH-mediated solubility of Bacillus thuringiensis var. san diego native delta-endotoxin crystals. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 184(2): p. 692-9.

Kos, M., et al., Transgenic plants as vital components of integrated pest management. Trends Biotechnol, 2009. 27(11): p. 621-7.

Kumar, S., A. Chandra, and K.C. Pandey, Bacillus thuringiensis (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. J Environ Biol, 2008. 29(5): p. 641-53.

Li, J.D., J. Carroll, and D.J. Ellar, Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis at 2.5 Å resolution. Nature, 1991. 353(6347): p. 815-21.

Lilley, M., R.N. Ruffell, and H.J. Somerville, Purification of the insecticidal toxin in crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J Gen Microbiol*, 1980. 118(1): p. 1-11.

Loseva, O., et al., 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*, 2002. 32(5): p. 567-77.

Luo, K., D. Banks, and M.J. Adang, Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl Environ Microbiol*, 1999. 65(2): p. 457-64.

Luttrell, R.G., L. Wan, and K. Knighten, Variation in Susceptibility of Noctuid (Lepidoptera) Larvae Attacking Cotton and Soybean to Purified Endotoxin Proteins and Commercial Formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 1999. 92: p. 21-32.

Ma, G., et al., 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*, 2005. 35(7): p. 729-39.

MacIntosh, S.C., et al., Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J Invertebr Pathol*, 1990. 56(2): p. 258-66.

Mahbubur Rahman, M., H.L. Roberts, and O. Schmidt, Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephestia kuehniella*. *J Invertebr Pathol*, 2007. 96(2): p. 125-32.

Masson, L., et al., The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J Biol Chem*, 1995. 270(35): p. 20309-15.

Matten, S.R., G.P. Head, and H.D. Quemada, How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops within IPM programs, in *Integration of insect resistant genetically modified crops within IPM programs*, J. Romeis, A.M. Shelton, and G.G. Kennedy, Editors. 2008, Springer: New York. p. 441.

McNall, R.J. and M.J. Adang, Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003. 33(10): p. 999-1010.

Midboe, E.G., M. Candas, and L.A. Bulla, Jr., Expression of a midgut-specific cadherin BT-R1 during the development of *Manduca sexta* larva. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003. 135(1): p. 125-37.

Moar, W.J., et al., Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Appl Environ Microbiol*, 1990. 56(8): p. 2480-3.

- Monnerat, R., et al., Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. *Appl Environ Microbiol*, 2006. 72(11): p. 7029-35.
- Morin, S., et al., Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(9): p. 5004-9.
- Munoz-Garay, C., et al., Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1788(10): p. 2229-37.
- Munro, S., Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 2003. 115(4): p. 377-88.
- Nagamatsu, Y., et al., Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998. 62(4): p. 727-34.
- Ochoa-Campuzano, C., et al., An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 362(2): p. 437-42.
- Oppert, B., et al., Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem*, 1997. 272(38): p. 23473-6.
- Ortega, A., *Insectos nocivos del maíz; una guía para su identificación en el campo*. 1987, México, D. F.: CIMMYT. 106.
- Parker, M.W. and S.C. Feil, Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*, 2005. 88(1): p. 91-142.
- Pashey, D.P., Current status of armyworm host strains. *Florida Entomol.*, 1988. 71(3): p. 227-34.
- Pigott, C.R. and D.J. Ellar, Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007. 71(2): p. 255-81.
- Purcell, J.P., J.T. Greenplate, and R. Douglas Sammons, Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1992. 22(1): p. 41-47.
- Rajagopal, R., et al., Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J Biol Chem*, 2002. 277(49): p. 46849-51.
- Raymond, M., *Présentation d'un Programme d'analyse Log-probit Pour Micro-Ordinateur*. *Sér. Ent. Med et Parasitol*, 1985. 22(2): p. 117-121.
- Robertson, J.L., et al., Natural Variation: A Complicating Factor in Bioassays with Chemical and Microbial Pesticides. *Journal of Economic Entomology*, 1995. 88: p. 1-10.

Roh, J.Y., et al., *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol*, 2007. 17(4): p. 547-59.

Romeis, J., M. Meissle, and F. Bigler, Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat Biotechnol*, 2006. 24(1): p. 63-71.

Roush, R.T. and J.C. Daly, The role of populations genetics in resistance research and management, in *Pesticide resistance in arthropods*, B.E. Tabashnik and R.T. Roush, Editors. 1990, Chapman and Hall: New York. p. 97-152.

Sanvido, O., J. Romeis, and F. Bigler, Ecological impacts of genetically modified crops: ten years of field research and commercial cultivation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007. 107: p. 235-78.

Sims Steven, B., et al., Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins, in *Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance*. 1996, American Chemical Society: Washington, DC. p. 229-242.

Slaney, A.C., H.L. Robbins, and L. English, Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin CryIII<sub>A</sub>: An analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1992. 22(1): p. 9-18.

Soberon, M., S.S. Gill, and A. Bravo, Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(8): p. 1337-49.

Soberon, M., et al., Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 2007. 318(5856): p. 1640-2.

Tabashnik, B.E., Evolution of Resistance to *Bacillus Thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, 1994. 39(1): p. 47-79.

Tabashnik, B.E., et al., Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J Econ Entomol*, 2003. 96(4): p. 1031-8.

Tabashnik, B.E., et al., Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat Biotechnol*, 2008. 26(2): p. 199-202.

Tabashnik, B.E., et al., Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 1998. 353(1376): p. 1751-1756.

Tabashnik, B.E., J.B. Van Rensburg, and Y. Carriere, Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *J Econ Entomol*, 2009. 102(6): p. 2011-25.

Thomas, W.E. and D.J. Ellar, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci*, 1983. 60: p. 181-97.

- Vadlamudi, R.K., T.H. Ji, and L.A. Bulla, Jr., A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J Biol Chem*, 1993. 268(17): p. 12334-40.
- Vadlamudi, R.K., et al., Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem*, 1995. 270(10): p. 5490-4.
- van Frankenhuyzen, K., Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol*, 2009. 101(1): p. 1-16.
- Van Rensburg, J.B.J., First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *S. Afr. J. Plant Soil*, 2007. 24(3): p. 147-151.
- Vankova, J., K. Horska, and K. Sebesta, The fate of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* caterpillars. *J Invertebr Pathol*, 1974. 23(2): p. 209-12.
- Visser, B., et al., A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J Bacteriol*, 1990. 172(12): p. 6783-8.
- Walters, F.S., et al., An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against Western corn rootworm larvae. *Appl Environ Microbiol*, 2008. 74(2): p. 367-74.
- Wang, P., X. Zhang, and J. Zhang, Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005. 35(6): p. 611-20.
- Wolfersberger, M.G., 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*, 1990. 46(5): p. 475-7.
- Xu, X., L. Yu, and Y. Wu, Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Environ Microbiol*, 2005. 71(2): p. 948-54.
- Yang, Y., et al., Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl Environ Microbiol*, 2007. 73(21): p. 6939-44.
- You, T.H., et al., Blocking binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to *Bombyx mori* cadherin receptor results in only a minor reduction of toxicity. *BMC Biochem*, 2008. 9: p. 3.
- Zhang, X., et al., 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*, 2005. 12(11): p. 1407-16.

Zhang, X., et al., 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*, 2006. 103(26): p. 9897-902.

Zhuang, M., et al., *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J Biol Chem*, 2002. 277(16): p. 13863-72.