



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Optimización de la toxina Cry1AcMod de  
*Bacillus thuringiensis* contra insectos  
Lepidópteros”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA LAURA MARTÍNEZ DE CASTRO JIMÉNEZ



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. María Alejandra Bravo de la Parra

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# Hoja de datos del jurado

---

1. Datos del alumno

Martínez de Castro

Jiménez

Diana Laura

47 52 67 36

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304026449

2. Datos del tutor

Dra.

María Alejandra

Bravo

de la Parra

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Claudia

Segal

Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Gerardo Alfonso

Corzo

Burguete

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Ernesto

Ortiz

Suri

6. Datos del sinodal 4

Dra.

María de los Angeles

Cancino

Rodezno

7. Datos del trabajo escrito

Optimización de la toxina Cry1AcMod de *Bacillus thuringiensis* contra insectos Lepidópteros

78 p.

2014

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. María Alejandra Bravo de la Parra.

**Dedico este trabajo:**

*Con cariño a mi madre Isabel Jiménez Juárez y a mi padre Q.E.P.D. Alfonso José Martínez de Castro Barona. Porque me han enseñado a ser perseverante, por su apoyo y amor incondicional en el aspecto académico y personal. Definitivamente sin su respaldo no hubiera sido posible la culminación de esta meta.*

*A mi hermano Alfonso Eduardo Martínez de Castro Jiménez por su apoyo, siempre constante, moral y económico, por sus consejos y haber estado a mi lado en cada momento. Te quiero mucho.*

*A Andrés Alberto Arrocha Arcos, por alentarme a dar lo mejor de mí, por tu amor y comprensión. Te amo con todo mi corazón.*

**Agradezco:**

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología, por haberme brindado la valiosa oportunidad de prepararme académicamente, por el espacio y los recursos dados para la obtención de mi título de Licenciatura.*

*A la Dra. Alejandra Bravo por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza, tiempo y dedicación.*

*Al Dr. Mario Soberón por las sugerencias y críticas siempre oportunas a este trabajo.*

*Al Dr. José Luis Puente por dedicar su tiempo y esfuerzo en la coordinación el taller “La Biología a partir de las Biomoléculas” del cual forme parte.*

*A la Dra. Liliana Pardo por haberme enseñado a trabajar dentro del laboratorio, por su tiempo y consejos.*

*A los Dres. Isabel Gómez, Blanca Inés García y Carlos Muñoz por el apoyo académico y sugerencias al proyecto.*

*A los integrantes del comité en la revisión de esta tesis: Dra. Claudia Segal, Dr. Gerardo Corzo, Dr. Ernesto Ortiz y Dra. María de los Angeles Cancino, por sus observaciones que enriquecieron este trabajo.*

*A mis compañeros del laboratorio: Leivi, Daniela, Jazmín, Luis Enrique, Biviana, Esmeralda, Rosalba, Alan, Violeta, Emiliano, Josué y Fernando, por su apoyo y los buenos momentos que compartimos durante mi estancia en el laboratorio.*

*A Sergio Blancas, Lizbeth Cabrera, Jorge Sánchez y Graciela Domínguez en el trabajo diario, son una parte muy importante para el funcionamiento del laboratorio.*

*A mis amigos de la Facultad de Ciencias: Erik, Federico, Eduardo, Lucila, Fidel, Ixchel y Tere por todos los ratos que compartimos con alegría, las prácticas de campo siempre divertidas y los momentos de ocio.*

# TABLA DE CONTENIDO

---

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	5
<b>ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
1.1 Características generales de Bt.....	9
1.2 Ciclo de vida de Bt.....	10
1.3 Regulación y expresión de genes <i>cry</i> durante la fase de esporulación.....	11
1.3.1 Gen <i>cry1Aa</i> .....	12
1.3.2 Gen <i>cry3Aa</i> .....	12
1.4 Toxinas insecticidas.....	13
1.4.1 Clasificación y nomenclatura.....	13
1.4.2 Estructura de las toxinas Cry-3D.....	14
1.5 Mecanismo de acción de toxinas Cry-3D.....	16
1.5.1 Solubilización y activación proteolítica.....	17
1.5.2 Identificación de los receptores.....	18
1.5.3 Epítopes de unión en las toxinas.....	19
1.5.4 Inserción de la toxina.....	20
1.5.5 Formación de poro.....	20
1.6 Resistencia en insectos.....	21
1.6.1 Mecanismos de resistencia en insectos.....	22
1.6.1.1 Poblaciones de insectos resistentes: defectos en la unión con el receptor.....	22
1.6.1.2 Poblaciones de insectos resistentes: activación proteolítica.....	23

1.6.1.3 Poblaciones de insectos resistentes: síntesis de oligosacáridos.....	24
1.6.2 Estrategias para contener la resistencia en insectos.....	24
1.6.2.1 Efecto en pirámide.....	24
1.6.2.2 Toxinas Cry1AMod.....	24
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>26</b>
2.1 Mecanismo de acción de las toxinas Cry1AMod.....	26
2.2 Toxicidad de Cry1AMod.....	27
2.3 Expresión de genes <i>cry</i> bajo el control del promotor <i>cry3A</i> .....	30
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Hipótesis.....	33
4.2 Objetivos.....	33
4.2.1 Objetivo general.....	33
4.2.2 Objetivos particulares.....	33
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
6.1 Diseño de oligonucleótidos.....	35
6.2 Ensayos de PCR: Amplificación del gen <i>cryIAcMod</i> .....	36
6.3 Electroforesis de DNA.....	37
6.4 Purificación de plásmidos bacterianos.....	37
6.5 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	37
6.6 Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> MC1061.....	37
6.7 Obtención de células de Bt 407 <sup>-</sup> electrocompetentes.....	38

6.8 Obtención de los plásmidos de expresión pHT315 con los promotores <i>cry3A/A</i> , <i>cry3A/B</i> y <i>cry3A/C</i> .....	38
6.9 Clonación del gen <i>cry1AcMod</i> en el vector pJET 1.2.....	40
6.10 Ligaciones de DNA.....	41
6.11 Transformación de células electrocompetentes mediante pulso eléctrico (electroporación).....	42
6.12 PCR de colonia.....	42
6.12.1 Protocolo para células de <i>E. coli</i> .....	42
6.12.2 Protocolo para células de Bt.....	43
6.13 Secuenciación de DNA.....	45
6.14 Obtención de la suspensión espora-cristal.....	45
6.15 Cuantificación de proteína.....	45
6.16 Electroforesis de proteínas.....	45
6.17 Bioensayos de toxicidad en larvas de primer estadio de <i>M. sexta</i> .....	46
<b>7. RESULTADOS</b> .....	47
7.1 Obtención del gen <i>cry1AcMod</i> bajo la regulación de los promotores <i>cry3A</i> : <i>procry3A/A</i> , <i>procry3A/B</i> y <i>procry3A/C</i> en el vector pHT315.....	47
7.1.1 Amplificación del gen <i>cry1AcMod</i> .....	47
7.1.2 Purificación de bandas que contienen el vector pHT315 con el promotor <i>cry3A</i> .....	48
7.1.3 Análisis de las colonias transformantes en <i>E. coli</i> por PCR.....	48
7.1.3.1 Cry1AcMod bajo la regulación del promotor <i>cry3A/A</i> .....	49
7.1.3.2 Cry1AcMod bajo la regulación del promotor <i>cry3A/B</i> .....	49
7.1.3.3 Cry1AcMod bajo la regulación del promotor <i>cry3A/C</i> .....	50
7.2 Expresión del gen <i>cry1AcMod</i> bajo el promotor <i>cry3A / A, B, C</i> en Bt y solubilización.....	50

7.3 Bioensayos en larvas de <i>M. sexta</i> .....	51
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	52
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	56
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	57
<b>11. APÉNDICE</b> .....	58
<b>12. REFERENCIAS</b> .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Microfotografía de Bt en microscopio electrónico de transmisión.
<b>Figura 2</b>	Fases de la esporulación en Bt.
<b>Figura 3</b>	Representación esquemática del promotor de la toxina Cry1A.
<b>Figura 4</b>	Representación esquemática del promotor de la toxina Cry3A.
<b>Figura 5</b>	Representación de la estructura tridimensional de las toxinas Cry-3D.
<b>Figura 6</b>	Mecanismo de acción de las toxinas Cry-3D. Modelo de formación de poro y Modelo de transducción de señales.
<b>Figura 7</b>	Modelo de formación de poro de la toxina Cry1Ab en <i>M. sexta</i> .
<b>Figura 8</b>	Mecanismos de resistencia a toxinas Cry.
<b>Figura 9</b>	Formación del oligómero por las toxinas Bt silvestres y modificadas.
<b>Figura 10</b>	Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a <i>P. xylostella</i> .
<b>Figura 11</b>	Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a <i>T. ni</i> .
<b>Figura 12</b>	Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a <i>P. gossypiella</i> .
<b>Figura 13</b>	Secuencia de DNA 5' del gene <i>cryIA</i> .
<b>Figura 14</b>	Western blot contra las proteínas sintetizadas en cepas <i>E. coli</i> y Bt incubadas con anticuerpos específicos contra Cry2Ab.
<b>Figura 15</b>	SDS-PAGE al 12% que muestra la co-expresión de HaCa1 y la toxina Cry1Ac en dos cultivos distintos.
<b>Figura 16</b>	SDS-PAGE del contenido de endotoxina en las cepas transformantes BMB171 FBK y BMB171 F31.

- 
- Figura 17** Secuencia de DNA del promotor *cry3A* con sitios de restricción.
- Figura 18** Representación de los vectores pHT315 con las versiones del promotor *cry3A*.
- Figura 19** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt que muestra la amplificación del gen completo *cry1AcMod*.
- Figura 20** Geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt que muestra las bandas purificadas por columna.
- Figura 21** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt que muestra las colonias positivas de la transformación del vector pHT315-pcry3A/A más el gen *cry1AcMod*.
- Figura 22** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt que muestra las colonias positivas de la transformación del vector pHT315-pcry3A/B más el gen *cry1AcMod*.
- Figura 23** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt que muestra las colonias positivas de la transformación del vector pHT315-pcry3A/C más el gen *cry1AcMod*.
- Figura 24** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de las proteínas Cry1AcMod.
- Figura 25** Comparación en peso molecular y activación de las toxinas Cry1A y Cry3A.
- Figura 26** Resultado del análisis *in silico* de la formación de enlaces disulfuro en la proteína Cry1AcMod.
- Figura 27** Representación esquemática de la probable formación de enlaces disulfuro en la proteína Cry1AcMod.
-

## ABREVIATURAS

---

Ácido desoxirribonucleico	<b>DNA</b>
Amino terminal	<b>N-terminal</b>
AMP cíclico	<b>cAMP</b>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<b>Bt</b>
BrEt	<b>Bromuro de etidio</b>
Carboxilo terminal	<b>C-terminal</b>
Glicosilfosfatidilinositol	<b>GPI</b>
Kilodaltones	<b>kDa</b>
Kilo base (s) = (1000 pares de bases)	<b>Kb</b>
<i>Lethal concentration</i> <sub>50</sub> (en español, concentración letal <sub>50</sub> )	<b>LC<sub>50</sub></b>
Litro	<b>L</b>
Luria-Bertani	<b>LB</b>
Microlitro	<b>μL</b>
Miliamperios	<b>mA</b>
Mililitro	<b>mL</b>
Microgramo	<b>μg</b>
Oligo <i>forward</i>	<b>F</b>
Oligo <i>reverse</i>	<b>R</b>
Pares de bases	<b>pb</b>
Polipropileno	<b>pp</b>
Protein Data Bank	<b>PDB</b>
Revoluciones por minuto	<b>rpm</b>
Toxinas Cry1A modificadas	<b>Cry1AMod</b>
Volts	<b>V</b>
Wats	<b>W</b>

## RESUMEN

---

Las toxinas Cry producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) son efectivas para controlar diversos insectos plaga, adicionalmente son biodegradables e inocuas para mamíferos, incluyendo humanos (Bravo *et al.*, 2007). Las toxinas Bt han sido utilizadas en forma de aerosol sobre cultivos durante décadas y en plantas transgénicas desde 1996 (Sanahuja *et al.*, 2011). Se ha plantado maíz y algodón transgénicos que producen las toxinas de Bt en más de 58 millones de hectáreas en todo el mundo hasta el 2010 (James, 2010). Sin embargo, la principal amenaza para la eficacia a largo plazo de las toxinas de Bt es la aparición de la resistencia en los insectos plaga (Kruger *et al.*, 2009; Tabashnik *et al.*, 2009; Storer *et al.*, 2010; Dhurua *et al.*, 2011; Sanahuja *et al.*, 2011).

Las toxinas Cry se producen como protoxinas que son activadas en el intestino larvario, posteriormente se unen a receptores que inducen la oligomerización e inserción en la membrana intestinal, formando un poro iónico que lisa a las células del intestino y mata a las larvas (Gómez *et al.*, 2002b). En el laboratorio, se diseñaron las toxinas Cry1A modificadas (Cry1AbMod y Cry1AcMod), estas proteínas carecen de la hélice  $\alpha 1$  y se ha comprobado que son capaces de matar eficientemente a insectos resistentes a toxinas Cry silvestres (Soberón *et al.*, 2007). No obstante, en algunas especies de insectos susceptibles, la toxicidad se encuentra considerablemente reducida (Tabashnik *et al.*, 2011).

Por lo tanto, las toxinas Cry1AMod tienen el gran potencial de ser utilizadas para control de insectos en el campo. En el laboratorio se han realizado diversos intentos para producir variantes las toxinas Cry1AMod, no obstante, se han encontrado fallas en el sistema de expresión. En el presente trabajo se plantea el uso del promotor *cry3A* con la finalidad de optimizar este sistema de expresión para obtener nuevas variantes de la toxina Cry1AcMod que sean potencialmente activas contra larvas de lepidópteros susceptibles y resistentes.

Se obtuvieron las construcciones del gen *cry1AcMod* bajo tres versiones del promotor *cry3A*. Sin embargo, las proteínas no presentaron actividad biológica contra larvas de *M. sexta* y son insolubles en pH alcalino. La expresión de la proteína Cry1AcMod bajo la regulación del promotor *cry3A* genera un plegamiento no funcional, favoreciendo la formación de agregados y por lo tanto, las proteínas son insolubles y no son tóxicas. Este sistema no resultó ser óptimo para la expresión de otras toxinas Cry1AMod.

# 1. INTRODUCCIÓN

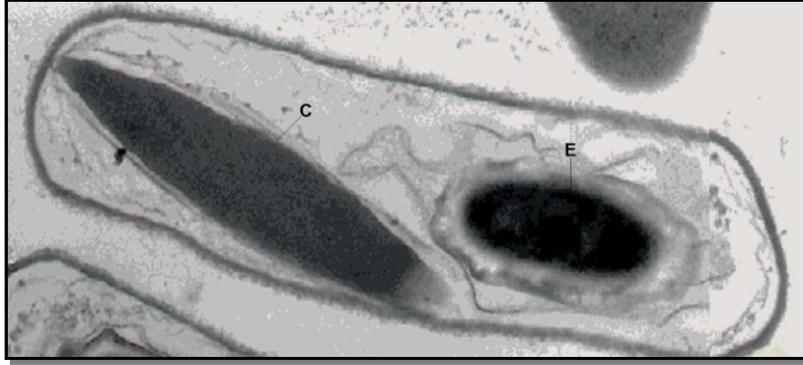
---

El control de insectos plaga en la agricultura y de vectores de enfermedades humanas se ha realizado principalmente con la aplicación de insecticidas químicos. Sin embargo, estos insecticidas son recalcitrantes y contaminan el medio ambiente, además muchos insectos han desarrollado resistencia hacia ellos, lo cual ha resultado en un incremento en su uso generando daños graves en la salud humana (Bernhard *et al.*, 1997). Consecuentemente, se ha generado un creciente interés en el desarrollo de estrategias alternativas para el control de las plagas (Roh *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2007).

Uno de los logros en este sentido ha sido el tratamiento de las plagas mediante el uso de bioinsecticidas o plantas transgénicas. Desde 1996 se ha cultivado plantas transgénicas-Bt que producen las proteínas Cry insecticidas de la bacteria Bt; estos cultivos controlan las plagas de manera eficiente y han ayudado a reducir el uso de insecticidas químicos (Kleter *et al.*, 2007; Qaim y Zilberman, 2003). El empleo de esta tecnología presenta muchos beneficios ya que las proteínas Cry son altamente específicas contra insectos blanco, completamente biodegradables, inocuas para humanos, vertebrados y plantas, y son efectivas para el control de plagas de plantas de importancia agrícola así como para controlar a insectos vectores de enfermedades humanas (Bravo *et al.*, 2007).

## 1.1 Características generales de Bt

Bt es una bacteria aeróbica, Gram-positiva y ubicua; se han aislado cepas de Bt en todo el mundo en diversos hábitats, incluyendo suelo, polvo de productos almacenados, insectos, hojas secas, entre otros (Bernhard *et al.*, 1997; Chaufaux *et al.*, 1997; Nester *et al.*, 2002). Bt es miembro del grupo *Bacillus cereus* que también incluye a *B. cereus*, *B. anthracis*, y *B. mycooides*. La característica que distingue a Bt de otros miembros del grupo *B. cereus* es que contiene un megaplásmido con la información necesaria para sintetizar las toxinas insecticidas Cry. Bt produce proteínas insecticidas ( $\delta$ -endotoxinas) durante la fase de esporulación como inclusiones parasporales que se pueden observar en la **figura 1**, los cristales pueden estar formados por una o más proteínas, llamadas toxinas Cry y Cyt (Höfte *et al.*, 1989; Helgason *et al.*, 2000).



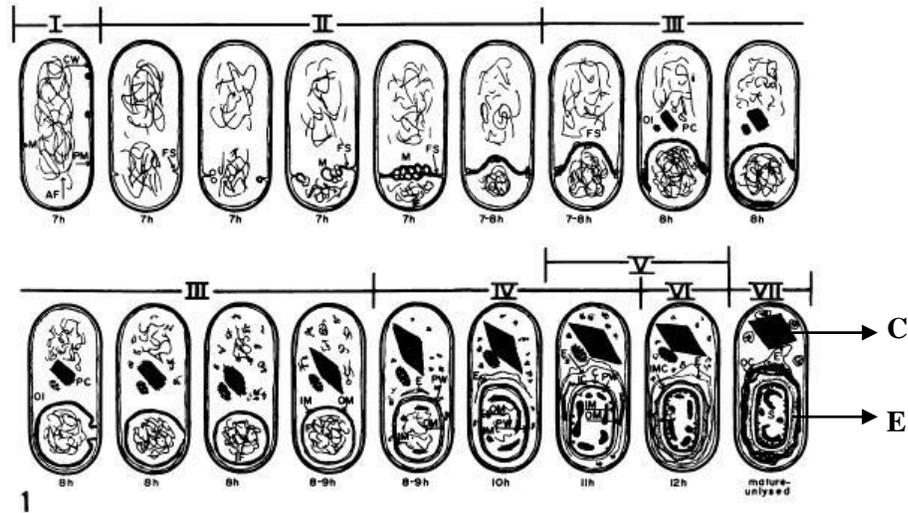
**Figura 1.** Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry (C) y una espora en proceso (E) (tomada de Soberón y Bravo, 2007).

## 1.2 Ciclo de vida de Bt

El ciclo de vida de Bt se caracteriza por dos fases, que incluyen división de las células vegetativas y la formación de esporas. La célula vegetativa tiene forma de bastón (2-5 micras de largo y 1 micra de ancho) y se divide asexualmente en dos células hijas uniformes por la formación de un septo de división a mitad de lo largo de la membrana plasmática (Bulla *et al.*, 1980).

La esporulación consiste en la división celular asimétrica y se caracteriza por siete etapas (**figura 2**) que incluyen la formación de filamentos axiales (fase I), formación del septo de la pre-espora (fase II), primera aparición de cristales paraesporales y la formación de una pre-espora (fase III), formación del exosporio, pared celular primordial, transformación de la espora y nucleoide y maduración de esporas (fases IV a VI) y lisis de los esporangios (fase VII) (Bulla *et al.*, 1980).

La producción de los cristales proteicos de Bt durante la esporulación es un fenómeno regulado genéticamente (Crickmore *et al.*, 1998), que probablemente compensa el estrés físico por la pérdida de agua durante la formación de la espora y ofrece la ventaja adicional de supervivencia, ejerciendo acción letal contra los insectos blanco. A su vez, la acción tóxica ofrece nutrientes suficientes que permiten la germinación de la esporas bacterianas y regresan al crecimiento vegetativo (Helgason *et al.*, 2000).



**Figura 2. Fases de la esporulación en Bt.** De forma esquemática se ilustran las siete fases del proceso de esporulación en Bt. Cristal (C) y Espora (E) (tomada de Bulla *et al.*, 1980).

### 1.3 Regulación y expresión de genes *cry* durante la fase de esporulación

Uno de los aspectos particulares de la esporulación de Bt es la formación de los cristales paraesporales que involucra la acumulación de proteínas Cry. Una característica común de los genes *cry* es que se expresan durante la fase estacionaria del crecimiento y por lo general se acumulan en la célula madre como inclusiones cristalinas a partir de la fase III y hasta la fase VII de la esporulación (Schnepf *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1998).

Los productos finales de la expresión de los genes *cry* constituyen el 20-30% del peso seco de las células. (Bulla *et al.*, 1980). La cantidad de cristales proteicos que produce un cultivo de Bt en condiciones de laboratorio es alrededor de 0.5 mg de proteína/ml y el tamaño de los cristales indican que cada célula sintetiza  $1 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  de moléculas  $\delta$ -endotoxinas durante la fase estacionaria para formar un cristal (Du *et al.*, 1994).

La síntesis elevada de las proteínas Cry es un evento controlado coordinadamente por una serie de mecanismos que ocurren a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional. Los genes *cry* se clasifican como dependientes o independientes de la esporulación en base a sus mecanismos transcripcionales (Schnepf *et al.*, 1998). Por lo general, el proceso de esporulación de Bt está controlado por la activación sucesiva de factores sigma que unen a la RNA polimerasa (Moran, 1993).

Se han descrito cinco factores de transcripción específicos,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$  y  $\sigma^K$ , que están fuertemente regulados y aparecen en un orden consecutivo durante la esporulación. El

factor  $\sigma^H$  está activo en la célula antes de la división;  $\sigma^E$  y  $\sigma^K$  están activos en la célula madre, y  $\sigma^F$  y  $\sigma^G$  están activos en la pre-espora (Lereclus *et al.*, 2000).

### 1.3.1 Gen *cryIAa*

El mecanismo de transcripción del gen *cryIAa* es dependiente de la esporulación. Se expresa a través de dos promotores que se encuentran sobrelapados, denominados BtI (en azul) y BtII (en rojo) (**figura 3**). La transcripción del promotor río abajo BtI se activa entre las fases II y VI de la esporulación y emplea el factor  $\sigma^E$ . Posteriormente, la transcripción se produce por el promotor río arriba BtII, que se activa a partir de la etapa VI hasta el final de la esporulación y emplea el factor  $\sigma^K$ . El uso secuencial de los dos promotores asegura la síntesis de la protoxina en todo el ciclo de esporulación (Wong *et al.*, 1983).



**Figura 3. Representación esquemática del promotor de la toxina Cry1A.** Los promotores BtI/BtII se encuentran sobrelapados. En azul se muestra las cajas -35 y -10 de BtI y en rojo las cajas -35 y -10 de BtII así como la región de unión al ribosoma (RBS).

### 1.3.2 Gen *cry3Aa*

El mecanismo de transcripción del gen *cry3Aa* es independiente de la esporulación, se activa entre el final de la fase exponencial de crecimiento vegetativo y la fase II de esporulación, y permanece activo hasta el estado IV (Juárez-Pérez, 2004; Schnepf *et al.*, 1998). El promotor *cry3A* es reconocido por el factor  $\sigma^A$ , el factor sigma de las células vegetales que se activa al final del crecimiento vegetativo exponencial y se mantiene activo a través de la tercera fase de esporulación (Sanchis *et al.*, 1996). Este promotor cuenta también con una secuencia de estabilización *Shine-Dalgarno* que se denomina STAB-SD

en la posición -125 y -117 en la región 5' no traducida que brinda estabilidad a los RNA mensajeros que se observa en la **figura 4** (Agaisse y Lereclus, 1996).



**Figura 4. Representación esquemática del promotor de la toxina Cry3A.** Se muestran con rojo las cajas -35 y -10, así como la región STAB-SD (flecha) y la región de unión al ribosoma (RBS).

## 1.4 Toxinas insecticidas

### 1.4.1 Clasificación y nomenclatura

Como se mencionó anteriormente, las  $\delta$ -endotoxinas forman dos familias multigénicas, *cry* y *cyt* (Schnepf *et al.*, 1998). Las proteínas Cry son específicamente tóxicas contra órdenes de insectos: Lepidóptera (mariposas y polillas), Coleóptera (escarabajos), Himenóptera (abejas, avispa y hormigas), y Díptera (mosquitos), y también existen algunas proteínas Cry activas hacia Nematoda (gusanos). En contraste, las toxinas Cyt se encuentran principalmente en cepas activas de Bt contra Díptera. (Guerchicoff *et al.*, 2001).

Las proteínas Cry comprenden 70 subgrupos con más de 200 miembros (Crickmore *et al.*, 2002). La nomenclatura se basa en la identidad de secuencia primaria entre las diferentes proteínas. Los componentes de los cristales proteicos reciben la nomenclatura de proteínas Cry y cuatro rangos jerárquicos formados por números, letras mayúsculas y minúsculas, y números (ej. Cry1Ab1). Los rangos dependen de la identidad de secuencia que comparten con otras proteínas Cry. Se da un número diferente (primer rango) a una proteína si comparte menos del 45% de identidad con todas las demás proteínas Cry (ej. Cry1, Cry2, etc.). La letra mayúscula (segundo rango) se da si la proteína comparte menos del 78% pero más del 45% de identidad con un grupo particular de proteínas Cry (ej. Cry1A, Cry1B, etc.). El tercer rango, una letra minúscula, se da para distinguir proteínas que comparten más del 78% de identidad, pero menos del 95% con otras proteínas Cry (ej.

Cry1Aa, Cry1Ab, etc.). Finalmente, se da un número para distinguir proteínas que comparten más del 95% de identidad, pero que no son idénticas y deben considerarse variantes de la misma proteína (Crickmore *et al.*, 1998, 2002).

Este sistema de clasificación no toma en cuenta la selectividad de las toxinas Cry, no obstante, algunos subgrupos de toxinas Cry presentan toxicidad contra un determinado orden de insectos. Así, las proteínas Cry1 son principalmente activas contra insectos lepidópteros, mientras que las proteínas Cry3 son tóxicas hacia coleópteros (Höfte *et al.*, 1989). En el caso de toxinas activas contra dípteros, existe un gran número de diferentes subgrupos que son activos contra estos insectos, por ejemplo: las toxinas Cry2Aa (Sasaki *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2010), Cry4 y Cry11 (Armengol *et al.*, 2006), Cry16, Cry17 y Cry29 (Gamma *et al.*, 2014).

La familia de proteínas Cry de 3 Dominios (Cry-3D) son moléculas globulares que contienen tres distintos dominios conectados por vínculos simples. El alineamiento de sus secuencias revela la presencia de cinco bloques conservados (Bravo *et al.*, 1997). Sin embargo, algunos bloques están ausentes en algunos miembros de la familia Cry-3D. Una característica particular de los miembros de esta familia es la presencia de protoxinas con dos diferentes longitudes (130 kDa y 70 kDa). La extensión del extremo C-terminal que se encuentra en protoxinas grandes es dispensable para la toxicidad y se cree que juega un papel importante en la formación de las inclusiones cristalinas dentro de la bacteria (de Maagd *et al.*, 2001).

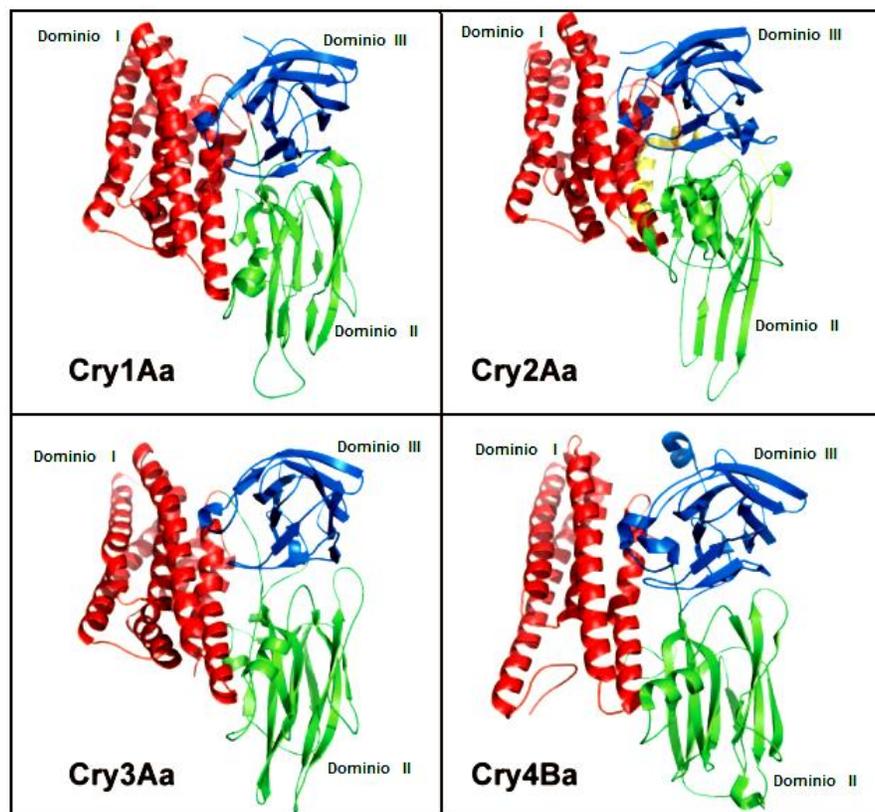
#### **1.4.2 Estructura de las toxinas Cry-3D**

Estas proteínas se encuentran conformadas por tres dominios estructurales (Li *et al.*, 1991) que se observan en la **figura 5**. El dominio I es un ramillete de siete  $\alpha$ -hélices en el cual la hélice central (hélice  $\alpha$ -5) está rodeada por las hélices externas. Este dominio comparte similitud en la estructura con otras toxinas formadoras de poro como: colicina Ia y N (PDB: 1cii y 1a87), hemolisina E (PDB: 1qoy) y toxina diftérica (PDB: 1ddt) (Soberón *et al.*, 2010). Con base en la similitud, así como datos de mutantes puntuales aisladas en el dominio I, se sugiere que el papel de este dominio es la formación del poro iónico en la membrana del insecto blanco (Jiménez *et al.*, 2007).

En el caso del dominio II se compone de tres láminas- $\beta$  plegadas antiparalelas empacadas rodeando un centro hidrofóbico formando un arreglo de prisma de estructuras- $\beta$  (Li *et al.*, 1991); comparte similitud en estructura con varias proteínas de unión a carbohidratos como vitelina (PDB: 1vmo), lectinas relacionadas con jacalina (PDB: 1jac), y lectina Mpa (PDB: 1jto) (Soberón *et al.*, 2010). Diversos datos experimentales mediante mutagénesis sitio dirigida indican que este dominio determina especificidad; es el dominio más variable dentro de la familia Cry-3D (de Maagd *et al.*, 2001).

El dominio III posee una estructura de  $\beta$ -sándwich (Li *et al.*, 1991), también para este dominio se han identificado proteínas de unión a carbohidratos con estructura similar como la 1,4- $\beta$ -glucanasa proteína de unión a celulosa CenC (PDB: 1ulo), galactosa oxidasa (PDB: 1gof), sialidasa (PDB: 1eut),  $\beta$ -glucuronidasa (PDB: 1bhg), la proteína de unión a carbohidratos dominio de xilanasa U (PDB: 1gmm), y la  $\beta$ -galactosidasa (PDB: 1bgl). Estos resultados sugieren que los motivos de unión a carbohidratos pudieran tener un papel importante en el mecanismo de acción de estas toxinas Cry-3D, específicamente en el reconocimiento e interacción de las toxinas y sus receptores en la membrana (Soberón *et al.*, 2010). Este dominio es responsable de la especificidad: intercambios del dominio III resultaron en cambios de especificidad (de Maagd *et al.*, 2001).

Los contactos entre los dominios II y III (que corresponden a láminas  $\beta$ -11 y  $\beta$ -12) así como la región interior del dominio III (que corresponde a láminas  $\beta$ -17 y  $\beta$ -23 y la hélice  $\alpha$ 5 central del dominio I) están altamente conservados dentro de la familia de toxinas Cry-3D (Bravo *et al.*, 2010).



**Figura 5. Representación de la estructura tridimensional de las toxinas Cry-3D.** El dominio I (en color rojo) está involucrado en la formación de poro. El dominio II (en color verde) y el dominio III (en color azul) tienen regiones particulares de interacción con receptores secundarios, lo cual les confiere especificidad (tomada de Piggot y Ellar, 2007).

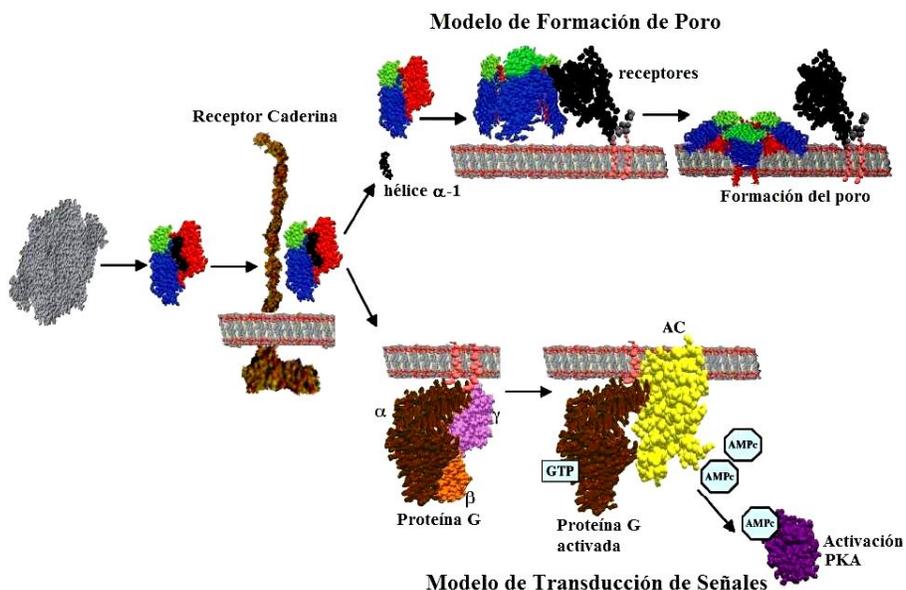
## 1.5 Mecanismo de acción de las toxinas Cry-3D

Se han propuesto dos hipótesis diferentes para el mecanismo de acción de estas toxinas, una se basa en la formación del poro (Bravo *et al.*, 2004; Pigott y Ellar, 2007; Sabino *et al.*, 2009) y otra en la inducción de señalización intracelular (Zhang *et al.*, 2006). Los primeros pasos en ambos modelos son similares: los cristales de las toxinas son ingeridos por la larva y se solubilizan en el intestino en protoxinas (**figura 6**). Posteriormente se cortan por proteasas para dar lugar a una toxina Cry- 3D de 60kDa que incluye la hélice  $\alpha-1$  y el extremo N-terminal (Bravo *et al.*, 2007). La toxina activada es capaz de unirse al receptor de caderina que se encuentra en las microvellosidades de las células del intestino medio y se unen con gran afinidad (Vadlamudi *et al.*, 1995).

Cuando las toxinas Cry1A interaccionan con la caderina, se facilita un corte proteolítico adicional en el N-terminal de la toxina, en el cual se elimina la hélice  $\alpha-1$  del dominio I (Gómez *et al.*, 2002b), resultando en la oligomerización de la toxina. El oligómero de la toxina incrementa su afinidad hacia los receptores secundarios anclados a la membrana por un puente de glicosilfosfatidilinositol (GPI), como la aminopeptidasa N en *Manduca sexta* o la fosfatasa alcalina en *Heliothis virescens* (Bravo *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2007; Jurat-Fuentes *et al.*, 2006). Finalmente, el oligómero de la toxina se inserta en balsas lipídicas, donde se forman los poros y posteriormente provoca que las células estallen, resultando en la muerte de la larva (Bravo *et al.*, 2007; Pardo-López *et al.*, 2006; Zhuang *et al.*, 2002).

En contraste, en el modelo de transducción de señales, en la unión de Cry1A a la caderina, se asume se que activa una cascada de señalización que involucra la estimulación de una proteína G y la adenilato ciclasa para incrementar los niveles intracelulares de cAMP, resultando en la activación de la proteína quinasa A, que a su vez conduce a la muerte celular por aumento de la presión oncótica (Zhang *et al.*, 2006).

El mecanismo de acción de las toxinas Cry-3D ha sido estudiado en diferentes órdenes de insectos y nemátodos. Los resultados de la mayoría de estos estudios apoyan el modelo de formación de poro (Bravo *et al.*, 2004; Pigott y Ellar, 2007). El modelo de transducción de señales se propuso de acuerdo a los estudios realizados en la línea celular H5 de *Trichoplusia ni* que proviene de ovario, la cual fue transfectada con el gen de la caderina de *M. sexta* (Zhang *et al.*, 2006).



**Figura 6. Mecanismo de acción de las toxinas Cry-3D. Modelo de formación de poro y modelo de transducción de señales.** Ambos modelos incluyen pasos iniciales idénticos. La protoxina es solubilizada en el lumen del intestino medio de los insectos, posteriormente la protoxina soluble es activada por proteasas, resultando una toxina Cry-3D monomérica y finalmente la toxina se une al receptor de caderina. En el modelo de formación de poro, la interacción con la caderina promueve el corte de la hélice  $\alpha-1$ , que permite la oligomerización de la toxina. La toxina Cry oligomérica se une a receptores anclados por GPI los cuales promueven la inserción de la membrana y formación de poros. En el modelo de transducción de señales, la interacción de la toxina con la caderina activa a una proteína G que incrementa la actividad de adenil ciclasa (AC), resultando en un aumento en los niveles de AMPc que a su vez activa la proteínquinasa A (PKA), que es responsable de la activación de un mecanismo intracelular que resulta en la muerte celular (tomada de Soberón *et al.*, 2009).

### 1.5.1 Solubilización y activación proteolítica

La solubilización de la mayoría de las toxinas Cry-3D depende del pH alcalino alto y de un ambiente reductor que se presenta en los intestinos de insectos lepidópteros y dípteros, en contraste con los intestinos de insectos coleópteros los cuales tienen un pH neutro o ligeramente ácido (Dow, 1986). Una porción del extremo C-terminal de las protoxinas contiene residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro en las inclusiones cristalinas y, por consiguiente, la reducción de los enlaces disulfuro es un paso necesario para la solubilización de protoxinas (Du *et al.*, 1994).

El procesamiento proteolítico de las toxinas Cry es un paso crítico involucrado no sólo en la activación de la toxina, también en su especificidad (Haider y Ellar, 1989; Haider *et al.*, 1989) y la generación de resistencia en insectos (Oppert *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 1998).

Además del pH, los lepidópteros y coleópteros difieren en el tipo de proteasas que presentan en su intestino. Las serín proteasas son las principales proteasas digestivas de Lepidóptera y Díptera, mientras que cisteín proteasas y proteasas aspárticas son abundantes en los intestinos medios de Coleóptera (Terra y Ferreira, 1994).

Las inclusiones cristalinas que son ingeridas por una larva susceptible se disuelven en el ambiente del intestino, se solubilizan las protoxinas inactivas y se digieren por proteasas presentes en el intestino medio, produciendo proteínas de 60-70 kDa (Choma *et al.*, 1990). La activación de las toxinas involucra la eliminación de un péptido del extremo N-terminal (25-60 aminoácidos) y aproximadamente la mitad de la proteína restante (aprox. 600 aminoácidos) desde el extremo C-terminal en el caso de protoxinas Cry de alto peso molecular (protoxinas de 130 kDa).

Para varias proteínas Cry, la inactivación dentro de los intestinos de los insectos implica el procesamiento intramolecular de la toxina (Choma *et al.*, 1990; Lambert *et al.*, 1996; Audtho *et al.*, 1999; Pang *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2001). Sin embargo, para otras toxinas Cry el procesamiento intramolecular no se relaciona siempre con una pérdida de toxicidad y a veces se requiere para la correcta activación de la toxina. Un ejemplo es el caso de las toxinas Cry activas contra mosquitos como Cry11A y Cry4B (Dai y Gill, 1993; Zalunin *et al.*, 1998; Yamagiwa *et al.*, 1999). Por lo tanto, en algunos casos, el procesamiento proteolítico diferencial de las toxinas Cry en diferentes insectos podría ser un paso limitante en la toxicidad de las proteínas Cry (Miranda *et al.*, 2001).

Una característica interesante de la activación de las toxinas Cry es su procesamiento en extremo N-terminal. Existen diversas evidencias que sugieren que el extremo N-terminal de las protoxinas Cry2A y Cry1Ac podría impedir la unión a membranas blanco (Martens *et al.*, 1995; Kouskoura *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2002). Por consiguiente, el procesamiento del extremo N-terminal de las protoxinas Cry puede desenmascarar una región de la toxina que es importante remover para inducir la correcta interacción de la toxina con sus receptores (Morse *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2002).

### **1.5.2 Identificación de los receptores**

El principal factor determinante de la selectividad de las toxinas Cry es la interacción con los receptores específicos en los intestinos de insectos susceptibles (Jenkins y Dean, 2000). Por lo tanto, la identificación de los receptores es fundamental para la determinación de las bases moleculares del mecanismo acción de las toxinas Cry y para el control de la resistencia en insectos, que en muchas ocasiones se ha visto que se correlaciona con defectos en la unión con el receptor (Ferré y Van Rie, 2002). Se han identificado una serie de moléculas receptoras específicas a la toxina Cry1. En *M. sexta*, las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se unen a la aminopeptidasa-N (APN) de 120 kDa (Knight *et al.*, 1994;

Garczynski y Adang, 1995; Denolf *et al.*, 1997), una proteína tipo caderina de 210 kDa (Bt-R<sub>1</sub>) (Belfiore *et al.*, 1994; Vadlamudi *et al.*, 1995) y una alcalino fosfatasa de 70 kDa (Jurat-Fuentes *et al.*, 2004).

Es interesante que los dominios II y III de las toxinas Cry tengan una homología estructural con varios dominios de proteínas que interaccionan con carbohidratos. Lo que no excluye la posibilidad de que los mismos pudieran tener interacciones proteína-proteína con las moléculas receptoras (Gómez *et al.*, 2002a). La interacción entre la toxina y sus receptores es compleja, involucra múltiples interacciones con diferentes epítopes. Únicamente se ha demostrado que en la interacción de la toxina Cry1Ac con APN participa una molécula del azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc). (Cooper *et al.*, 1998).

### 1.5.3 Epítopes de unión en las toxinas

La identificación de los epítopes involucrados en la interacción toxinas Cry-receptor ofrecerá una visión de las bases moleculares de la especificidad en insectos y podría ayudar en la caracterización de la resistencia en las poblaciones de insectos en la naturaleza (Bravo *et al.*, 2010).

Se han mapeado los epítopes de unión para varias toxinas Cry. Los dominios II y III son las regiones más variables de las toxinas Cry y han sido sujetos a estudios de mutagénesis sitio dirigida, para determinar su papel en el reconocimiento del receptor. El dominio II fue el primero en reconocerse como determinante de la toxicidad insecticida con base en construcciones de toxinas híbridas, utilizando genes *cry* con diferente selectividad (Ge *et al.*, 1989). El intercambio del dominio III indica que este dominio también está involucrado con el reconocimiento del receptor (Bosch *et al.*, 1994; de Maagd *et al.*, 2000). Se propone que este intercambio ha sido utilizado como un mecanismo evolutivo para cambiar la especificidad de estas toxinas (Bravo *et al.*, 1997; de Maagd *et al.*, 2001).

La interacción con los receptores es dinámica y compleja. Para las toxinas Cry1A activas contra lepidópteros se ha sugerido que el contacto ocurre a través de la  $\beta$ -16 y el asa 3 con los receptores ALP y APN en forma de monómero. Como se mencionó anteriormente, la interacción entre las asas 2, 3 y 8 con el receptor caderina (específicamente las regiones CR-7, CR-11 Y CR-12) promueve la oligomerización, posteriormente el asa 2 de la toxina en la forma oligomérica se une a los receptores ALP y APN. Estos receptores se localizan preferencialmente en balsas lipídicas, las cuales facilitan la inserción del oligómero formando un poro lítico (Sabino *et al.*, 2009).

La unión de las toxinas a la caderina induce la formación de un pre-poro. La caracterización de la capacidad de inserción a la membrana del pre-poro, las propiedades cinéticas del poro iónico formado por esta estructura y la resolución de su estructura tridimensional, podrían ser pasos importantes hacia la comprensión del papel de esta

estructura en el mecanismo de acción de las toxinas Cry (Bravo *et al.*, 2007). Se reportó que la hélice  $\alpha$ -3 participa en la oligomerización, ya que mutando esta hélice la toxina Cry1Ab pierde la capacidad de oligomerizar y por lo tanto, pierde por completo la toxicidad contra *M. sexta* y la actividad de formación de poro (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007).

#### 1.5.4 Inserción de la toxina

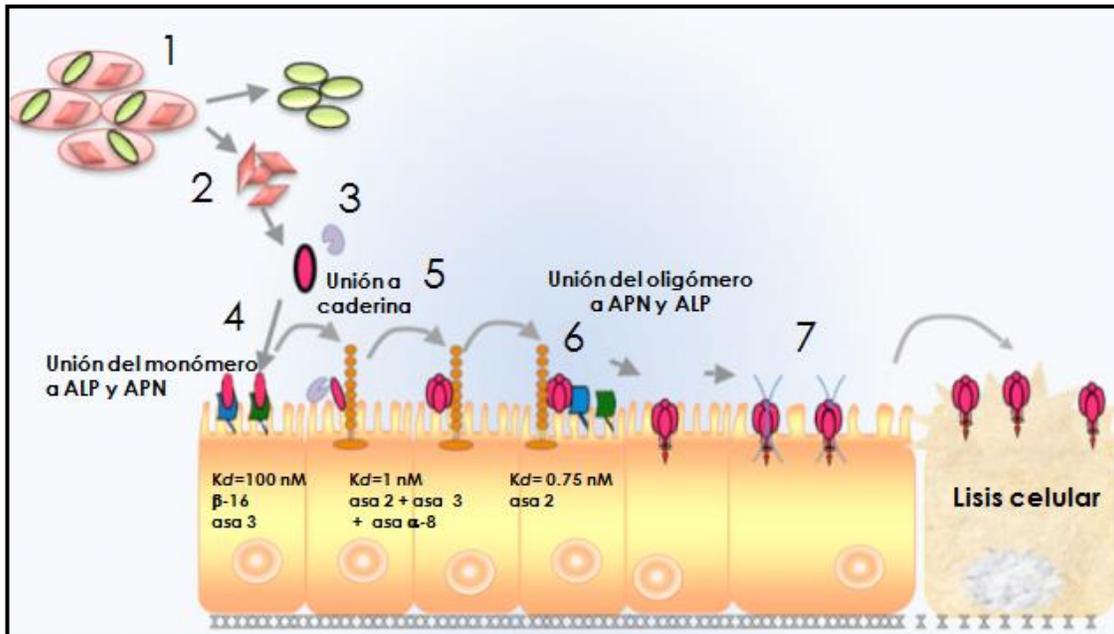
Después de la unión a sus receptores, las toxinas Cry se insertan dentro de la membrana de las células epiteliales del intestino medio para formar poros líticos. La inserción de las toxinas Cry en la membrana requiere un cambio conformacional importante en la toxina para exponer una superficie hidrofóbica, que puede interaccionar con la bicapa lipídica. El dominio I se ha reconocido como un dominio formador de poro en base a estudios de mutagénesis sitio dirigida (Wu y Aronson, 1992; Cooper *et al.*, 1998) y en la similitud de la estructura de este dominio con otros dominios formadores de poros de toxinas bacterianas, como la colicina Ia, dominio de traslocación difteria y hemolisina (Aronson y Shai, 2001).

El modelo mayoritariamente aceptado de la inserción de la toxina Cry3A propone que el par de hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 es la región que se inserta en la membrana y existen múltiples reportes que apoyan la hipótesis de que la hélice  $\alpha$ -4 juega un papel importante al ser la que flanquea el poro (Loseva *et al.*, 2001).

#### 1.5.5 Formación de poro

Con base en la observación de los estados de gran conductancia generadas por varias toxinas Cry en bicapas sintéticas planas (Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2002), la estimación del tamaño de poro en 10-20 Å (Von-Tersch *et al.*, 1994) y el peso molecular del oligómero de aproximadamente 250 kDa, se ha propuesto que el poro puede estar formado por un oligómero de las toxinas Cry que contienen 3 a 4 monómeros de la toxina (Muñoz *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que, en contraste con otras toxinas formadoras de poro, la actividad formadora de poros de las proteínas Cry1 no está regulada por pH ácido, sugiriendo que las toxinas Cry no son internalizadas en vesículas ácidas para su inserción, en contraste con otras toxinas formadoras de poro (Tran *et al.*, 2001). Se ha demostrado que el pH alcalino es importante para la formación del poro (Muñoz *et al.*, 2009). En la **figura 7** se resumen los pasos en el mecanismo de formación de poro anteriormente descritos en forma caricaturizada.



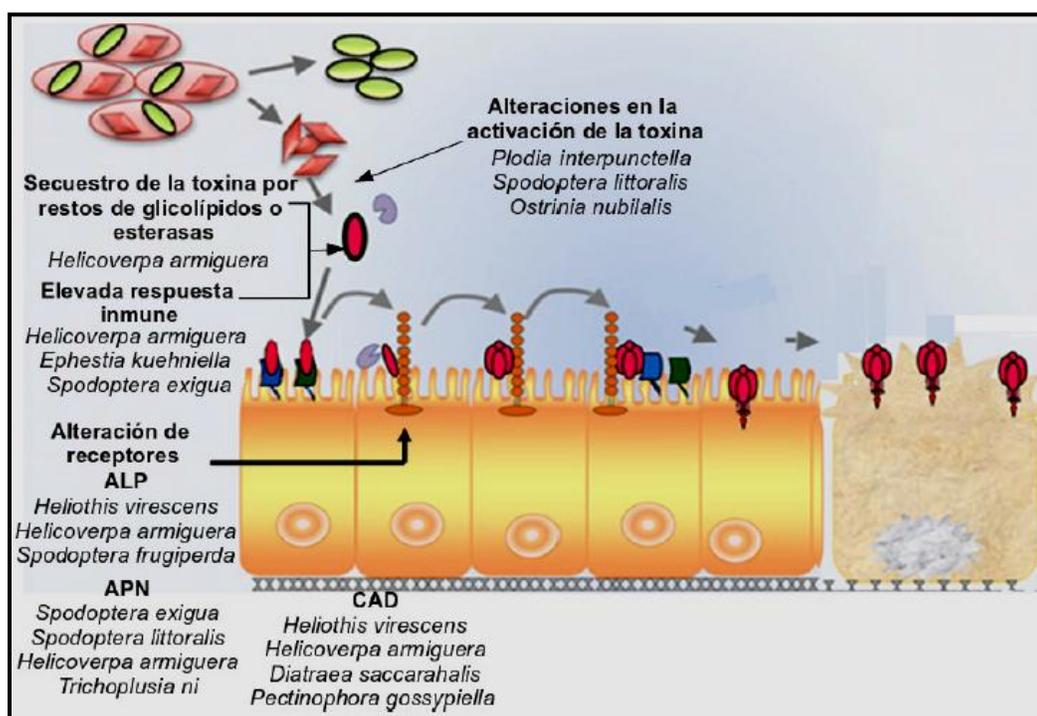
**Figura 7. Modelo de formación de poro de la toxina Cry1Ab en *M. sexta*.** Se muestran los pasos secuenciales en el mecanismo de acción. 1) Una larva susceptible ingiere la solución espора- cristal, 2) los cristales se solubilizan por el pH alcalino, 3) se libera la protoxina que es activada a un monómero por proteasas, 4) la toxina en su forma activa se une a los receptores ALP y APN con baja afinidad ( $K_d=100\text{nM}$ ) lo que permite la co-localización de la toxina en la membrana, 5) se favorece la interacción de la toxina con el receptor tipo caderina con mayor afinidad ( $K_d=1\text{nM}$ ), esta interacción induce la exposición de una región hidrofóbica que es escindida por proteasas resultando en la oligomerización de la toxina, 6) posteriormente el oligómero se une nuevamente a los receptores APN y ALP con mayor afinidad ( $K_d=0.75\text{nM}$ ) y finalmente 7) el oligómero se inserta en la membrana formando poros que resultan en la lisis celular (tomada de Pacheco, S., *et al.*, 2009).

## 1.6 Resistencia en insectos

Una de las principales preocupaciones respecto al uso de Bt es la generación de poblaciones de insectos resistentes a toxinas Cry. La resistencia a estas toxinas se puede obtener interfiriendo cualquiera de los pasos involucrados en el mecanismo de acción de las toxinas Cry. El análisis del mecanismo molecular de la resistencia de insectos hacia las toxinas de Bt ha sido, en su mayoría, fundamentado en el estudio de poblaciones de insectos resistentes seleccionados bajo condiciones de laboratorio y también encontrados en campo (Tabashnik 1994, 2003, 2008; Gould 1998; Griffiths y Aroian 2005; Ferré y van Rie 2002; Georghiou y Wirth 1997; Wirth *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2001; Janmaat y Myers 2003; Gahan *et al.*, 2001; Morin 2003; Xu 2005; Yang *et al.*, 2007; Gunning *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2004; Baxter *et al.*, 2005, 2008).

### 1.6.1 Mecanismos de resistencia en insectos

El mecanismo de resistencia que se observa con mayor frecuencia involucra defectos en la unión con el receptor caderina, aunque también se ha reportado la resistencia debido a defectos en la producción de proteasas en el intestino de la larva o una respuesta inmune elevada (**figura 8**) (Griffits y Aroian, 2005; Ferre y van Rie, 2002; Gunning *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2004).



**Figura 8. Mecanismos de resistencia a toxinas Cry.** Se enuncia el tipo de resistencia y las especies en las cuales se han encontrado (tomada de Bravo *et al.*, 2010).

#### 1.6.1.1 Poblaciones de insectos resistentes: defectos en la unión con el receptor

El modo de resistencia más común (también llamado modo I) observado en varios insectos lepidópteros, se caracteriza por un alto nivel de resistencia a la toxina Cry1A, que se presenta como carácter recesivo y también muestra una reducción en la unión de por lo menos una toxina Cry1A, así como la resistencia cruzada a Cry1F (Tabashnik, 1994). En *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella* y *Helicoverpa armigera*, el mecanismo de resistencia modo 1 está relacionado con mutaciones en el gen de la caderina (Tabashnik *et al.*, 2011).

En el caso de la línea YHD2 de *H. virescens* aislada en laboratorio resistente a la toxina Cry1Ac, muestra que una sola mutación fue la responsable del 40-80% del nivel de resistencia. La mutación fue mapeada y muestra que está relacionada con una inserción de un retrotransposón en el gene de caderina (Gahan *et al.*, 2001).

Se ha propuesto que las mutaciones en los genes de caderina son la base principal de la resistencia a toxinas Cry. Cepas seleccionadas en el laboratorio de *P. gossypiella* resistentes a Cry1Ac revelan tres alelos mutados de caderina que están asociados a la resistencia en insectos lepidópteros (Morin *et al.*, 2003). Otros insectos que presentan mutación en el gen caderina asociados a resistencia de la toxina Cry1A son *H. armigera* y *Ostrinia nubilalis* (Tabashnik *et al.*, 2011).

Una excepción es una población en *Plutella xylostella*, que desarrolló la resistencia a las aplicaciones de aerosol con la cepa HDI de Bt que contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2A (Tabashnik *et al.*, 2003). Esta población presenta el mecanismo de resistencia modo 1, pero aquí la resistencia que se observó no se relaciona a caderina (Baxter *et al.*, 2005), ni a ningún otro gen que codifica para las moléculas de los receptores putativos que han sido descritos en otros insectos a la fecha, como la aminopeptidasa-N, fosfatasa alcalina o glucolípidos (Baxter *et al.*, 2008); aún no se sabe por qué se volvió resistente. Es posible que esta población se beneficiara de las mutaciones en otras proteínas que son capaces de funcionar como el receptor caderina de la toxina en este insecto. Recientemente se demostró que esta mutación está ligada al transportador ABC-C2 (Gahan *et al.*, 2010), sin embargo, la participación de esta proteína en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A no se ha descrito con precisión. Se ha propuesto que podría ser una molécula de unión ya que mutaciones en el transportador ABC-C2 ligadas a resistencia a toxinas Cry1A también se han descrito para *Bombyx mori* y *Trichoplusia ni* (Atsumi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2013).

#### **1.6.1.2 Poblaciones de insectos resistentes: activación proteolítica**

En *Plodia interpunctella* se aisló una colonia de insectos resistente a toxinas Cry1A que presentan una menor producción de proteasas y por consiguiente se reduce la activación de la protoxina (Herrero *et al.*, 2001). Las cepas resistentes muestran crecimiento y morfología alterados, esto sugiere que ese alelo es necesario para el correcto crecimiento de las larvas, por lo tanto es poco probable que este alelo sea seleccionado en poblaciones libres en la naturaleza.

### **1.6.1.3 Poblaciones de insectos resistentes: síntesis de oligosacáridos**

La línea YHD2 de *H. virescens* resistente a Cry1Ac, presenta un patrón alterado de glicosilación de dos proteínas de 63 y 68 kDa localizadas en la microvellosidad, se mostró que esto se correlaciona con la resistencia y que corresponden a dos isoformas de la alcalino fosfatasa (Jurat-Fuentes *et al.*, 2002).

Esta línea contiene varias mutaciones responsables para este fenotipo resistente a Cry1Ac. Aunque en la mayoría de alelos resistentes, la disrupción del gen de la caderina altera el fenotipo de resistencia, también alteraciones de glicosilación en las proteínas de membrana de las microvellosidades incrementan este fenotipo (Jurat-Fuentes *et al.*, 2002).

## **1.6.2 Estrategias para combatir la resistencia en insectos**

### **1.6.2.1 Efecto en pirámide**

Para contender con la resistencia de insectos a plantas transgénicas-Bt se han planteado varias alternativas. Una de ellas es la acumulación o efecto en pirámide de toxinas. El concepto de piramidación se aplica cuando dos o más toxinas con diferentes mecanismos de acción, por ejemplo, que se unan a diferentes moléculas receptoras, se producen en la misma planta-Bt. En este caso, la posibilidad de generar insectos resistentes disminuye exponencialmente porque se requerirían múltiples mutaciones para perder la susceptibilidad de todas las toxinas (Bravo y Soberón, 2008).

En 2003, se produjeron las primeras plantas transgénicas de algodón que expresaban dos toxinas: Cry1Ac y Cry2Ab. Estas plantas-Bt han demostrado ser muy eficaces contra las plagas de lepidópteros (Chitkowski *et al.*, 2003). Se sabe que estas dos proteínas Cry se unen a receptores diferentes. Aunque la expresión en pirámide de toxinas es una forma eficaz de retrasar la resistencia en insectos, se ha demostrado que esta propuesta pierde su eficacia cuando las plantas transgénicas que expresan sólo un gen *cry*, por ejemplo *cry1Ac*, crecen en las proximidades de cultivos Bt que expresan dos genes *cry*, porque en este caso se seleccionaron los insectos resistentes a ambos tipos de plantas Bt (Zhao *et al.*, 2005). Por lo tanto, es crucial que los cultivos Bt pirámide se planten de manera aislada de otras plantas Bt. La eficacia de esta estrategia depende totalmente en la posibilidad de tener dos toxinas que maten al mismo insecto pero que se unan a receptores diferentes y esto no siempre se cumple para la mayoría de las plagas (Bravo y Soberón, 2008).

### **1.6.2.2 Toxinas Cry1AMod**

Otra estrategia diferente a la anterior, fue el diseño y construcción de las toxinas modificadas Cry1AbMod y Cry1AcMod, que carecen de la hélice  $\alpha$ -1 y son capaces de formar oligómeros en ausencia de caderina (Soberón *et al.*, 2007). Su eficacia se evaluó en

dos experimentos: a) mediante el silenciamiento del receptor caderina en larvas de *M. sexta* que resultaron ser altamente tolerantes a Cry1Ab y no así a la toxina Cry1AbMod y b) las toxinas modificadas también fueron capaces de matar a *P. gossypiella* resistentes, en las cuales se encontró que la resistencia a Cry1A se debe a deleciones en el gen de la caderina (Soberón *et al.*, 2007).

Se demostró que las toxinas Cry1AMod no requieren la interacción con el receptor de la caderina y matan células de insectos mediante la interacción con el segundo receptor APN, ya que son capaces de oligomerizar y forma poros líticos (Bravo y Soberón, 2008). Adicionalmente, se ha demostrado que son capaces de matar otras poblaciones de insectos resistentes como *T. ni* y *P. xylostella*. Estos datos indican que las toxinas Cry1AMod constituyen una herramienta muy eficaz para el control de insectos resistentes.

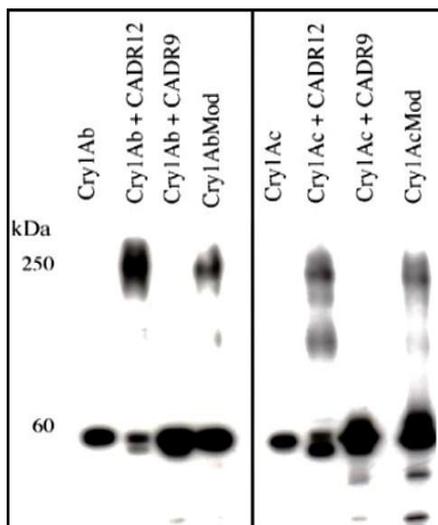
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Mecanismo de acción de las toxinas Cry1AMod

A diferencia del mecanismo de acción de las toxinas Cry1 silvestres, las toxinas modificadas Cry1AMod no requieren de la unión de la toxina al receptor caderina y del corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal que facilita la oligomerización (Soberón *et al.*, 2007; Muñoz-Garay *et al.*, 2009). Estos pasos son requeridos para facilitar la formación de un pre-poro con estructura oligomérica por las toxinas Cry-3D silvestres, el pre-poro oligomérico es importante para la inserción en la membrana y la toxicidad (Gómez *et al.*, 2002b; Rausell *et al.*, 2004).

Las proteínas Cry1AbMod y Cry1AcMod inducen la formación *in vitro* del pre-poro oligomérico sin necesitar la unión al receptor caderina, ni de fragmentos de la proteína de caderina conteniendo los sitios de unión de la toxina Cry o del anticuerpo en formato scFv (scFv73) el cual mimetiza a la región de unión a la toxina Cry presente en el receptor caderina (Gómez *et al.*, 2002b). En contraste, las proteínas Cry1A silvestres requieren de la presencia del anticuerpo scFv73 o de fragmentos de la proteína caderina o de la caderina para producir el pre-poro oligomérico *in vitro* (Soberón *et al.*, 2007).

Para demostrar que las toxinas Cry1AMod son capaces de formar estructuras oligoméricas de pre-poro, las protoxinas de Cry1AbMod y Cry1AcMod, fueron tratadas sólo con la proteasa tripsina, produciendo así los oligómeros de 250 kDa. En contraste, al hacer el mismo tratamiento con tripsina a las protoxinas de las toxinas silvestres, Cry1Ab y Cry1Ac, sólo se observa la estructura del monómero de 60 kDa (**figura 9**) (Soberón *et al.*, 2007).

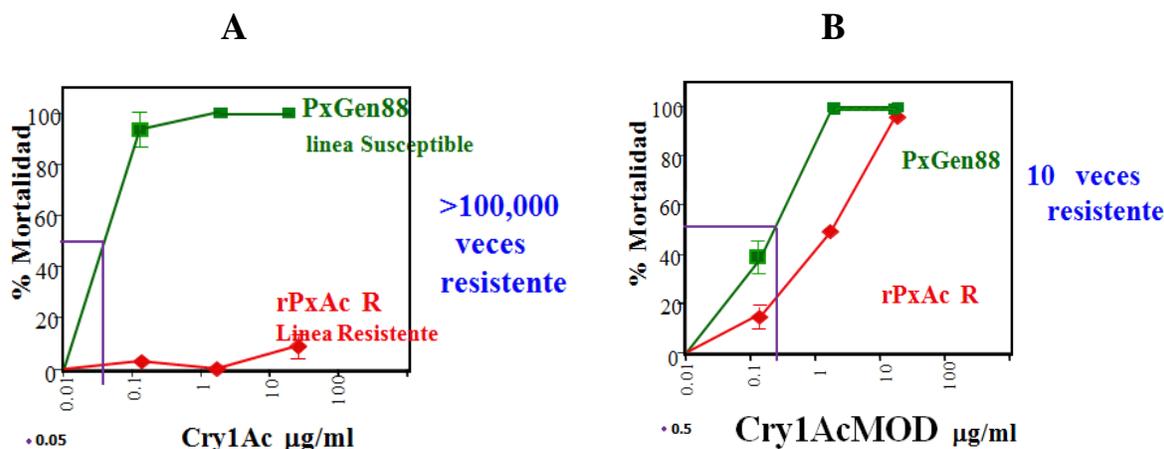


**Figura 9. Formación de Oligómero por Toxinas Bt nativas y modificadas.** Se añadieron fragmentos de caderina correspondientes a las regiones de unión con la toxina (CADR12, carriles 2 y 6) y regiones que no se unen a la toxina (CADR9, carriles 3 y 7). En Western blot se probó con anticuerpos policlonales a Cry1Ab (carriles 1 a 4) o a Cry1Ac (carriles 5 a 8) (tomada de Soberón *et al.*, 2007).

## 2.2 Toxicidad de Cry1AMod

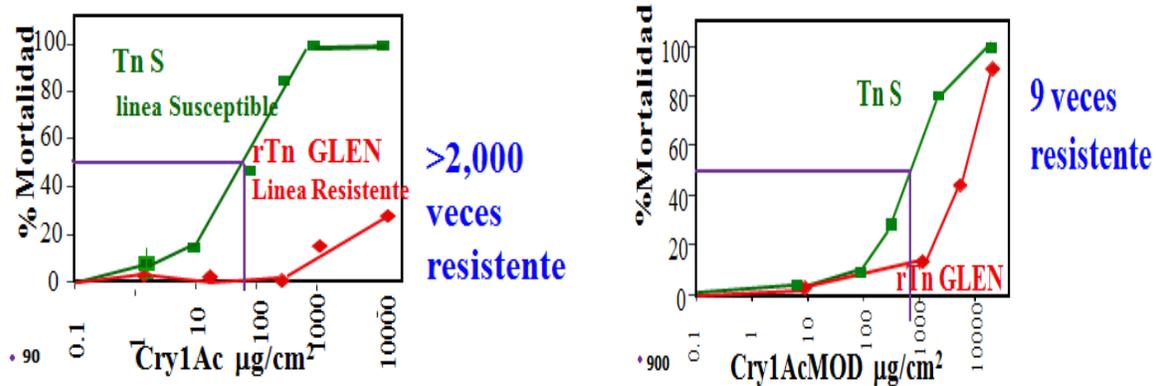
La toxicidad ha sido determinada en bioensayos alimentando a larvas de insectos susceptibles y resistentes con dietas que contienen diferentes concentraciones de las toxinas Cry1AMod. Se ha demostrado que las toxinas Cry1AMod son eficaces abatiendo insectos plaga que se han convertido en resistentes; sin embargo, actualmente se presenta pérdida de efectividad de estas toxinas contra insectos susceptibles (Soberón *et al.*, 2007; Tabashnik *et al.*, 2011). A continuación se describen algunos ejemplos:

1. *P. xylostella* (palomilla dorso de diamante): es el primer insecto que desarrolló resistencia a las toxinas Bt en el campo (Ferre y van Rie, 2002) no presenta mutaciones en el gen de caderina, sino en el transportador ABC-C2 (Gahan *et al.*, 2010). En la **figura 10.A** se retó con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible PxGen88 y a la línea resistente rPxAcR. Se encontró que la relación de resistencia fue de >100,000 para la toxina Cry1Ac silvestre. En la **figura 10.B** se retó con la toxina Cry1AcMod, tanto a la línea susceptible como resistente, encontrando que la relación de resistencia fue de 10; con la toxina Cry1AcMod se redujo notablemente la resistencia. Sin embargo, cuando se compara la toxicidad de la Cry1AcMod en la línea susceptible (línea verde) notamos que es aproximadamente 10 veces menos tóxica que la toxina Cry1Ac silvestre.



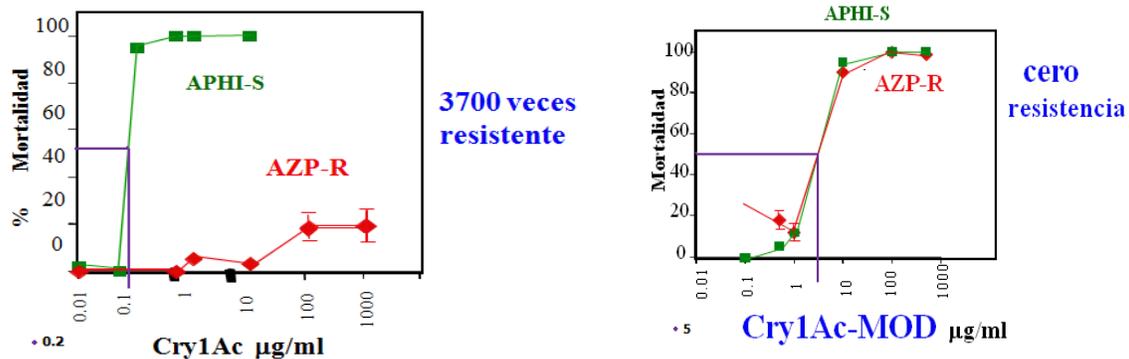
**Figura 10.** Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a *P. xylostella*. A) Se reta con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible PxGen88 (en color verde) y a la línea resistente rPxAcR (en color rojo), la relación de resistencia es de >100,000. B) Se reta con la toxina Cry1AcMod a la línea susceptible PxGen88 (en color verde) y a la línea resistente rPxAcR (en color rojo), la relación de resistencia es de 10. La línea en color morado indica la LC<sub>50</sub> aproximada en ambos tratamientos.

2. *T. ni* (gusano medidor de la col): Fue el segundo insecto resistente que se encontró en campo (Franklin *et al.*, 2009). La línea resistente rTn GLEN presentan una reducción en la expresión del receptor APN (Wang 2010). En la **figura 11.A** se retó con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible TnS y la línea resistente rTn GLEN. Se encontró que la relación de resistencia fue de >2,000 para la toxina Cry1Ac silvestre. En la **figura 11.B** se retó con la toxina Cry1AcMod, tanto a la línea susceptible como resistente, encontrando que la relación de resistencia fue de 9; con la toxina Cry1AcMod se redujo notablemente la resistencia. Sin embargo, cuando se compara la toxicidad de la Cry1AcMod en la línea susceptible (línea en color verde) notamos que es 10 veces menos tóxica que la toxina Cry1Ac silvestre.



**Figura 11.** Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a *T. ni*. A) Se reta con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible TnS (en color verde) y a la línea resistente rTn GLEN (en color rojo), la relación de resistencia es de >2,000. B) Se reta con la toxina Cry1AcMod a la línea susceptible TnS (en color verde) y a la línea resistente rTn GLEN (en color rojo), la relación de resistencia es de 10. La línea en color morado indica la LC<sub>50</sub> aproximada en ambos tratamientos.

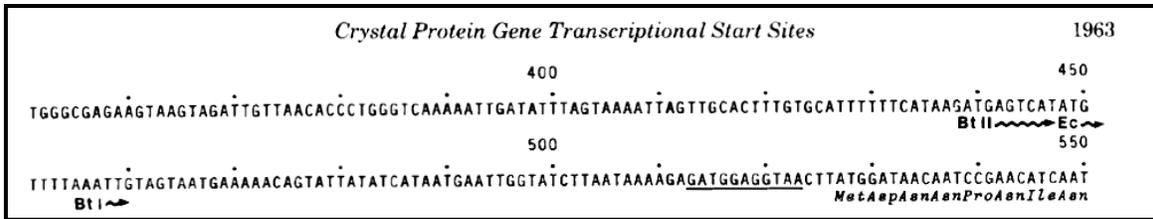
3. *P. gossypiella* (gusano rosado): La resistencia de la línea AZP-R se detectó en 1997 mediante la recopilación de individuos de 10 campos de algodón distintos en Arizona y presenta una mutación en el gen de caderina (Morin *et al.*, 2003). En la **figura 12.A** se retó con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible APhi-S y la línea resistente AZP-R. Se encontró que la relación de resistencia fue de 3,700 para la toxina Cry1Ac silvestre. En la **figura 12.B** se retó con la toxina Cry1AcMod, tanto a la línea susceptible como resistente, encontrando que la relación de resistencia fue de cero; con la toxina Cry1AcMod se abatió por completo resistencia. Sin embargo, cuando se compara la toxicidad de la Cry1AcMod en la línea susceptible (línea en color verde) notamos que es 25 veces menos tóxica que la toxina Cry1Ac silvestre.



**Figura 12. Gráficas del bioensayo retando a *P. gossypiella* con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod.** A) Se reta con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible APHI-S (en color verde) y a la línea resistente AZP-R (en color rojo), la relación de resistencia es de 3,700. B) Se reta con la toxina Cry1AcMod a la línea susceptible APHI-S (en color verde) y a la línea resistente AZP-R (en color rojo), la relación de resistencia es de cero. La línea en color morado indica la LC<sub>50</sub> aproximada en ambos tratamientos.

Estos resultados indican que las toxinas Cry1AMod no son tan efectivas respecto a las toxinas silvestres hacia insectos susceptibles, por lo que se decidió realizar un estudio sistemático en donde se escindieran diferentes regiones en el extremo N-terminal, con la finalidad de encontrar alguna variante que presentara una mayor toxicidad contra larvas de *M. sexta*, sin embargo, no fue posible analizar la toxicidad ya que durante el proceso de clonación se presentaron múltiples rearrreglos moleculares en *E. coli*, ocasionando que la toxina Cry1AcMod resultara tóxica para las células de *E. coli*, lo que provocó una contraselección de toxinas inactivas (González, 2009).

La expresión en *E. coli* podría explicarse mediante un estudio que realizaron Wong y col. en 1983 en el cual analizan los sitios de inicio de transcripción y traducción correspondiente a la proteína Cry1A, a través de su análisis por “mapeo por protección a nucleasa S1” (*S1 nuclease mapping*) en donde se comprueba que presenta un promotor de expresión fuga en *E. coli* (Wong *et al.*, 1983) esta región se indica en la **figura 13**.

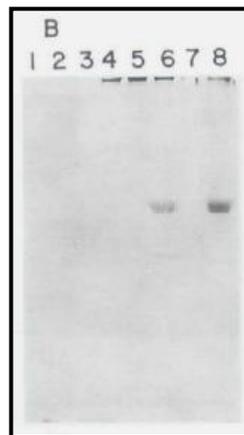


**Figura 13. Secuencia de DNA 5' del gen *cryIA*.** Las líneas onduladas indican el inicio de transcripción determinado por mapeo por protección a nucleasa S1. BtI, BtII y Ec, respectivamente, indican el sitio de inicio para RNAI y RNA II en Bt y el sitio de inicio en *E. coli* (tomada de Wong *et al.*, 1983).

Por lo tanto, para la producción de diversas toxinas Cry1AMod se requiere de la utilización alternativa de un promotor alterno al BtI/BtII que no presente expresión en *E. coli*.

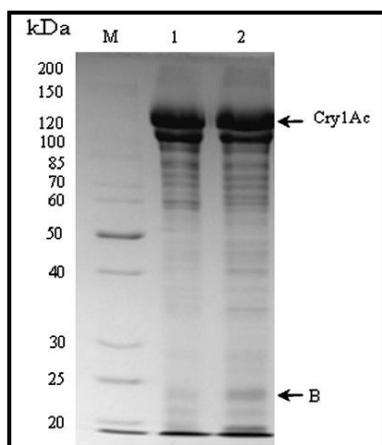
### 2.3 Expresión de genes *cry* bajo el promotor *cry3Aa*

En el año 1990, Dankocsik y col., reportaron que el gen *cry2Ab* de la cepa *Bacillus thuringiensis subespecie kurstaki* carece de un promotor funcional. Para lograr la expresión de este gen, reemplazaron la secuencia río arriba por la región regulatoria del gen *cry3Aa*. Comprobaron que la proteína sólo se expresa en células de *Bt* y no en *E. coli* mediante la técnica de Western blot (**figura 14**) contra el lisado celular de ambas bacterias, el promotor *cry3A* depende de factores sigma que se encuentran en *Bt*. La proteína resulto ser altamente tóxica *Lymantria dispar*, *Heliothis virescens* y *T. ni* (Dankocsik *et al.*, 1990).



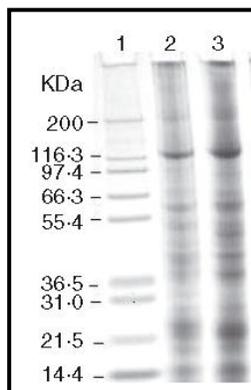
**Figura 14. Western blot contra las proteínas sintetizadas en cepas *E. coli* y Bt incubadas con anticuerpos específicos contra Cry2Ab.** Carriles: 1) *E. coli* (pEG220 Cry<sup>-</sup>), 2) *E. coli* (pEG230 Cry2Ab<sup>+</sup>), 3) *E. coli* (pEG267 Cry3A/Cry2Ab<sup>+</sup>), 4) Bt (pEG220 Cry<sup>-</sup>), 5) Bt (pEG243 Cry2Ab<sup>+</sup>), 6) Bt (pEG259 Cry3A/Cry2Ab<sup>+</sup>), 7) Bt (pEG2175 Cry2Ab) y 8) Bt HD-1 (Cry3A<sup>+</sup>/Cry2Ab<sup>+</sup>) (tomada de Dankocsik *et al.*, 1990).

Recientemente, se utilizó el promotor *cry3Aa* para expresar un fragmento de caderina del insecto *Helicoverpa armigera* denominado “*hacad1*” y el gen *cry1Ac* en un vector lanzadera pHT304 y se introdujo en la cepa acristalífera *Bt*BMB171. Se analizó la expresión de ambas proteínas mediante SDS-PAGE (**figura 15**), asimismo se determinó su actividad mediante bioensayos en *H. armigera* y *Spodoptera exigua*, encontrando un aumento en toxicidad de 5.1 y 6.5 veces respectivamente en contraste con la cepa que sólo expresa la proteína Cry1Ac (Peng *et al.*, 2010).



**Figura 15. SDS-PAGE al 12% que muestra la co-expresión de HaCa1 y la toxina Cry1Ac en dos cultivos distintos.** Carriles: 1) Marcador de proteínas, 2) Extracto del cultivo BMB701 de 36 horas y 3) Extracto del cultivo BMB1073 de 36 horas (tomada de Peng *et al.*, 2010).

En otro estudio se integró el gen *cry1Ac* en el cromosoma de *Bt* cepa acristalífera BMB171 bajo el control de los promotores *cry3A* y *cry1Ac* respectivamente. Se encontró que es mayor la expresión del gen *cry1Ac* bajo el promotor *cry3A* (**figura 16**), ambas construcciones de Cry1Ac forman cristales bipiramidales y se analizó su actividad mediante bioensayos, resultando ser tóxica contra el lepidóptero *Dendrolimus punctatus* (Chaoyin *et al.*, 2007).



**Figura 16. SDS-PAGE del contenido de endotoxina en las cepas transformantes BMB171 FBK y BMB171 F31.** Carriles: 1) Marcador de proteínas, 2) Cepa BMB171 FBK produciendo Cry1Ac (133 kDa) y 3) Cepa BMB171 F31 produciendo la toxina Cry1Ac (tomada de Chaoyin *et al.*, 2007).

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

Con base en los reportes anteriormente descritos se cree que es posible expresar la toxina Cry1AcMod bajo la regulación del promotor *cry3A*, de manera tal que no se exprese en *E. coli* pero que sí en resulte en una proteína funcional dentro de la bacteria *Bt*.

Esto permitirá generar de manera rápida y eficiente las variantes de toxinas Cry1AMod para obtener una proteína altamente tóxica contra insectos susceptibles y de esta manera optimizar la tecnología de toxinas Cry1AMod.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 4.1 Hipótesis

La fusión de la región regulatoria *cry3A* y el gen *cry1AcMod* dará como resultado la expresión eficiente de esta proteína en células de *Bt* y será biológicamente activa presentando actividad contra larvas del lepidóptero *M. sexta*.

### 4.2 Objetivos

#### 4.2.1 Objetivo general:

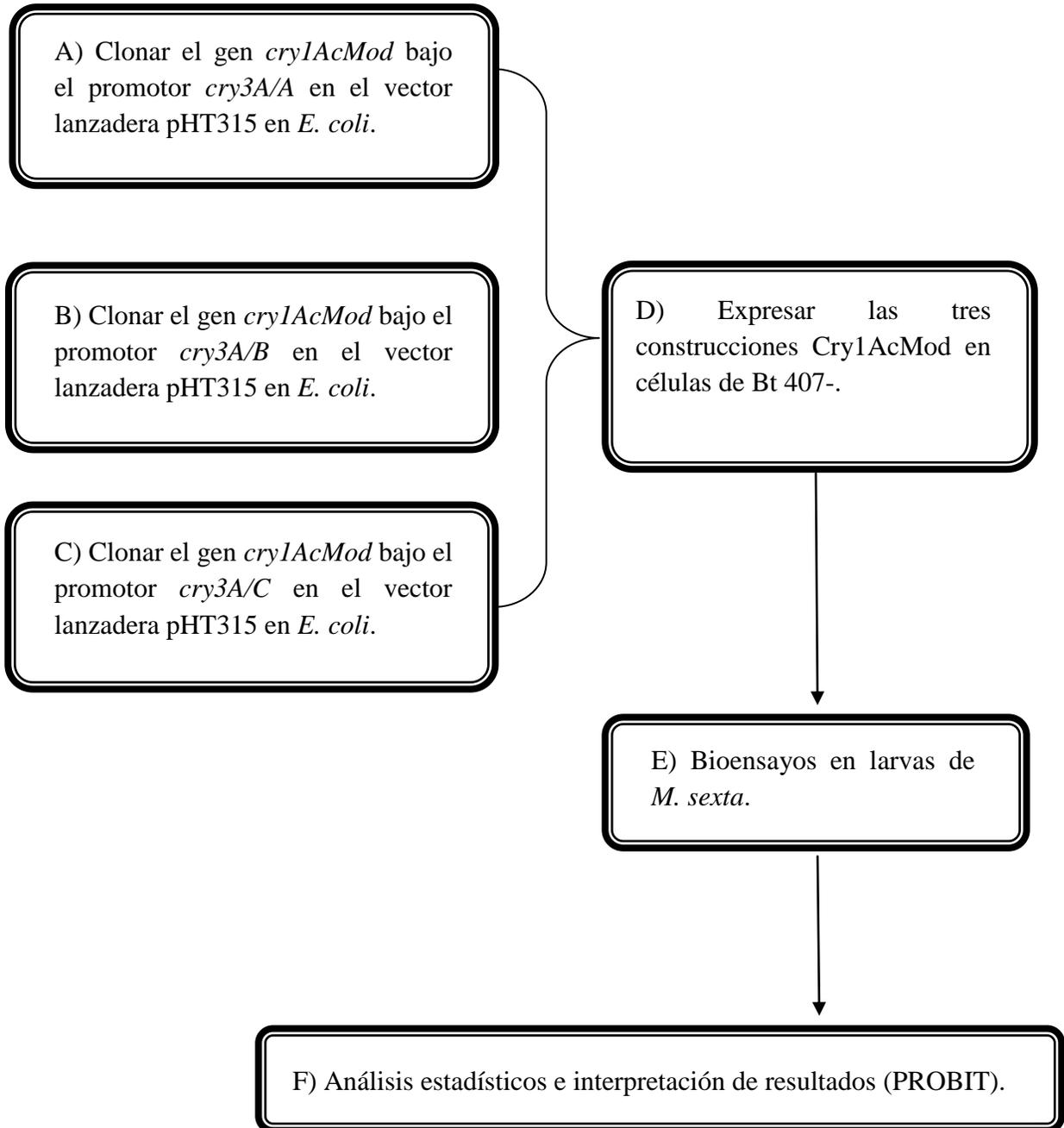
Analizar la expresión y toxicidad de la proteína Cry1AcMod bajo el promotor *cry3A*.

#### 4.2.2 Objetivos particulares:

- ✓ Clonar el gen *cry1AcMod* bajo el promotor *cry3A* en un vector lanzadera para transformar células acristalíferas de *Bt*.
- ✓ Verificar la formación de cristales bipiramidales y la expresión de la proteína Cry1AcMod.
- ✓ Realizar ensayos de solubilización en condiciones que simulen el intestino medio de insectos lepidópteros.
- ✓ Evaluar la toxicidad de la proteína Cry1AcMod realizando bioensayos en larvas de *M. sexta* para obtener la LC<sub>50</sub>.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

---



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 6.1 Diseño de oligonucleótidos

Con la finalidad de clonar el gen *cry1AcMod* en el vector lanzadera pHT315, se diseñaron los oligonucleótidos con el programa Oligo 7 (*Oligo Primer Analysis Software*). Algunos oligonucleótidos se utilizaron con la finalidad de insertar sitios de restricción para realizar las ligaciones de DNA. Se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante el método del fosfito-triéster en fase sólida.

Oligo	Tamaño (pb)	Secuencia (5'-3') y sitio de restricción
1. procry3A/A (forward)	29	CCA AGC TTC TGC AGT <u>CGA</u> AAC GTA AGA TG <i>TaqI</i>
2. procry3A/B (forward)	34	CCA <u>AGC TTC</u> TGC AGA ATT AAA GAT AAT ATC TTT G <i>HindIII</i>
3. procry3A/C (forward)	26	ACG <u>CGT CGA</u> CGA ATG ATT AAG ATT CC <i>SalI</i>
4. 1AcModNco (forward)	25	TGG ATC <u>CAT GGC</u> AGG ACT AGT TGA T <i>NcoI</i>
5. 1AcModTer (reverse)	25	AGT AAC <u>CCC GGG</u> GCT CCA TCT ACA <i>SmaI</i>
6. alfa5r (reverse)	34	TTA GGT ACC TAA TTG TCC AAA CAC TGA AAC ATC T
7. P6ALE (reverse)	29	ATA TTC AGC CTG <u>GAT CCT</u> TGC AGT AAC TG <i>BamHI</i>
8. pHT315 (forward)	22	GCT TCC GGC TCG TAT GTT GIG T
9. pHT315 (reverse)	25	GGG TTA TTG TTC TCA TGA CCG GAT AC

## 6.2 Ensayo de PCR: Amplificación del gen *cry1AcMod*

Condiciones de PCR:

Reactivo	DNA pHT3101 Cry1Ac	Control negativo
1. Buffer AccuPrime™ <i>Pfx</i> 10X	5 µL	5 µL
2. Oligo F <i>IAcModNco</i> 10 pmol/µL	1 µL	1 µL
3. Oligo R <i>IAcModTer</i> 10 pmol/µL	1 µL	1 µL
4. Templado de DNA 10 ng/µL	1 µL	-----
5. Enzima DNA Polimerasa AccuPrime™ <i>Pfx</i>	1 µL	1 µL
6. H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	41 µL	42 µL
<b>Volumen final</b>	<b>50 µL</b>	<b>50 µL</b>

La amplificación se realizó con el siguiente programa:

95°C	2 minutos	Un ciclo
95°C	15 segundos	} 30 ciclos
55°C	30 segundos	
68°C	4 minutos	
68°C	10 minutos	Un ciclo
4°	∞	

El templado de DNA utilizado fue de Cry1Ac silvestre (en pHT3101) el cual se encuentra bajo la regulación del promotor BtI/BtII. Este ensayo de PCR se realizó con la finalidad de obtener el gen completo *cry1AcMod* insertando los sitios 5' *NcoI* y 3' *SmaI* para poderlo fusionar posteriormente a cada vector pHT315 con el promotor *cry3A* a analizar. El tamaño del fragmento obtenido fue de 4.0 kb aproximadamente.

### **6.3 Electroforesis de DNA**

Se tomaron alícuotas de cada muestra de DNA para cargarlas en geles de agarosa al 1% con 0.04% de bromuro de etidio (10 mg/mL). Se utilizó una cámara *Mini Horizontal Submarine Unit Hoefer HE* (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) con buffer TAE 1X. La electroforesis se realizó aplicando 100 V durante un tiempo aproximado de 50 minutos. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 1 kb (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA). Para cuantificar la concentración de DNA se utilizó un equipo espectrofotométrico *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

### **6.4 Purificación de plásmidos bacterianos**

Para la purificación de plásmidos a partir de células transformadas de *E. coli* cepa MC1061, se utilizó el kit comercial *QIAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN, Valencia, CA). Los plásmidos se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

### **6.5 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa**

Se cargó un volumen de muestra de DNA en un gel de agarosa al 1% y se sometió a electroforesis a 100 V, por un tiempo aproximado de 50 minutos. El gel fue expuesto brevemente a la luz ultravioleta (365 nm) de una lámpara de 6 W (FOTODYNE Incorporated, Hartland, WI) para cortar una rebanada de gel que contenía la banda del peso deseado. Para la purificación de DNA a partir del gel se utilizó el kit comercial *MinElute Gel extraction kit* (QIAGEN, Valencia, CA).

### **6.6 Obtención de células competentes de *E. coli* MC1061**

Se tomó una colonia de células de *E. coli* MC1061 a partir de una placa de Petri con medio LB (Luria–Bertani) sólido adicionado con tetraciclina (12.5 µg/mL) y se creció un pre-inóculo toda la noche en 15 mL de medio líquido LB con tetraciclina (12.5 µg/mL) a 37°C y 200 rpm de agitación. Las bacterias obtenidas se utilizaron para inocular un matraz con 1L de medio LB líquido que se incubó a 37°C y 200 rpm con agitación, hasta que las células alcanzaron una densidad óptica aproximada de 0.6 leída a 600 nm. Se repartió en dos botellas de plástico previamente esterilizadas, cada una de 500 mL estériles y se mantuvieron en hielo 10 minutos. Se centrifugaron 10 minutos a 4,000 rpm a 4°C en una centrifuga *Beckman* (Beckman Coulter, Inc, Brea CA) con rotor de ángulo fijo. Se desechó el sobrenadante y se hizo un lavado de las pastillas celulares con 250 mL (c/u) de agua estéril a 4°C. Se volvió a centrifugar con las condiciones anteriores.

Se desecharon los sobrenadantes y las pastillas se lavaron con 250 mL de agua estéril a 4°C c/u. Se repartió el contenido en las botellas en dos. Se repitió la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se hizo un lavado con 20 mL de glicerol al 10% a 4°C (cada pastilla celular).

Se repartió el volumen en tubos de polipropileno (pp) de 50 mL y se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se suspendieron las pastillas celulares en 3 mL de glicerol al 10% a 4°C. Se hicieron alícuotas de 50 µL en tubos pp de 0.5 mL estériles. Se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70°C. Para verificar la eficiencia de transformación de las células, se realizó un control positivo utilizando plásmido superenrollado y un control negativo para descartar posible contaminación al momento de manipular las células.

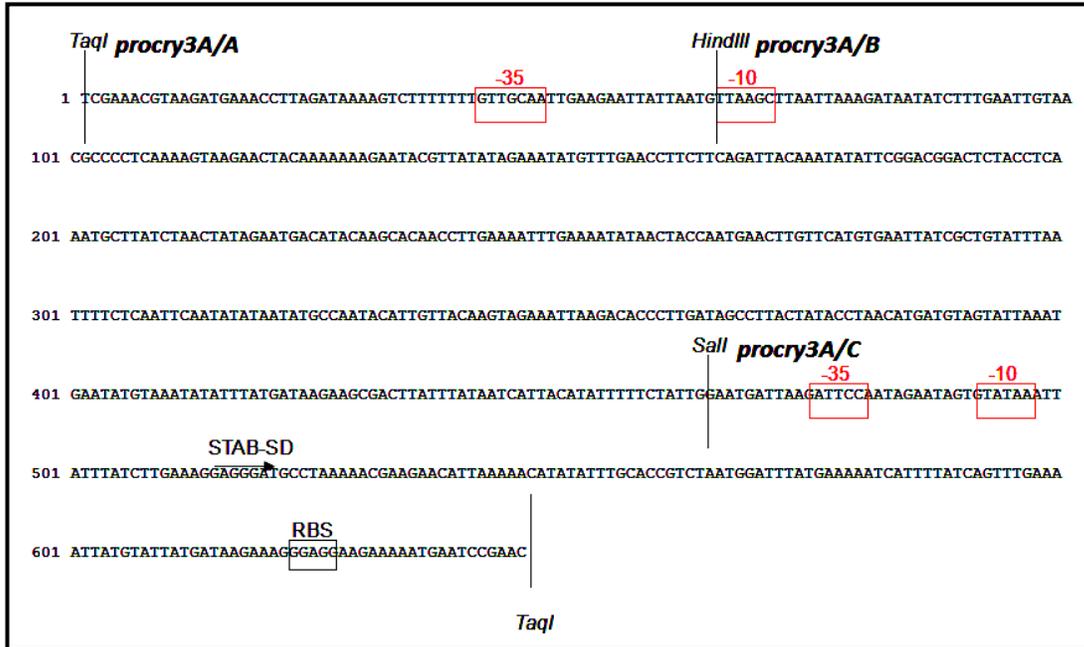
### **6.7 Obtención de células de Bt 407 *cry*<sup>-</sup> electrocompetentes**

La cepa acristalífera 407 *cry*<sup>-</sup> de Bt se sembró en una placa de Petri con medio LB sin antibiótico y se incubó a 30°C toda una noche, posteriormente se mantuvo a 4°C. En la tarde se inoculó una colonia en un matraz Erlenmeyer con 20 mL de medio BHI con 0.5% de glicerol estéril y se incubó a 30°C con 200 rpm durante toda la noche.

Al día siguiente se tomaron 3 mL del pre-cultivo para inocular un matraz Fernbach con 100 mL de medio BHI y 0.5% de glicerol estéril, se incubó a 30°C con agitación de 200 rpm hasta que las células alcanzaran una densidad óptica aproximada de 0.6 leída a 600 nm. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el resto se re-suspendió en 50 mL de buffer EB estéril frío. Se centrifugó nuevamente con las condiciones mencionadas y se suspendió en 3 a 5 mL de buffer EB y se prepararon alícuotas de 500 µL en tubos de pp estériles de 1.5 mL. Las alícuotas de células se utilizaron al momento.

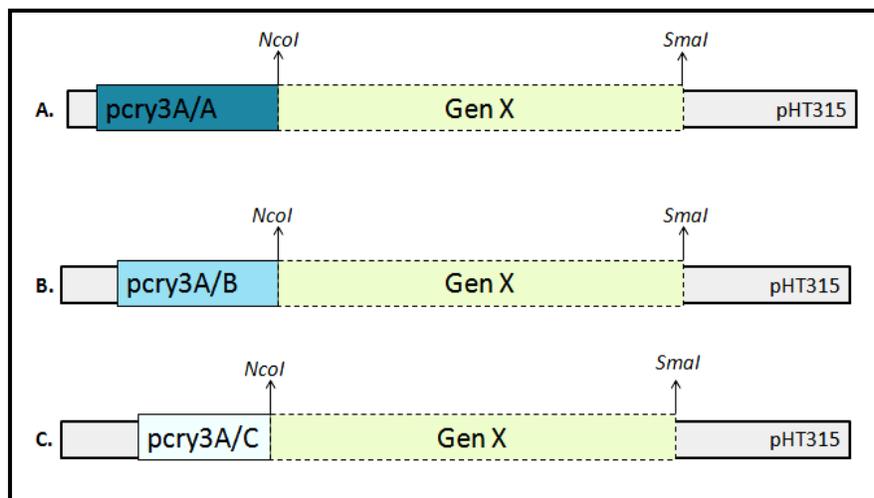
### **6.8 Obtención de los plásmidos pHT315 con promotor *cry3A/A*, *cry3A/B* y *cry3A/C***

Se utilizaron tres versiones del promotor *cry3A* las cuales se muestran en la **figura 17**; la diferencia entre cada uno de ellos radica en su longitud, siendo ***procry3A/A*** la más larga abarcando las dos cajas -35/-10 que inicia en el sitio *TaqI* hasta el segundo sitio *TaqI*; ***procry3A/B*** solamente incluye la segunda caja -35/-10, inicia en el sitio *HindIII* y termina en el segundo sitio *TaqI*; y la última versión ***procry3A/C*** también incluye esta caja sólo que es el más corto respecto a los anteriores e inicia en el sitio *Sall* hasta el segundo sitio *TaqI*. Cada una de las versiones del promotor *cry3A* se clonó en el vector pHT315, lo que permite que sea expresado en células de Bt y fueron proporcionados por la Dra. Blanca Inés García.



**Figura 17. Secuencia de DNA del promotor *cry3A* con los sitios de restricción.** Se muestran con líneas punteadas, los sitios de restricción en los cuales comienza cada una de las tres versiones que se analizaron.

Para la obtención de los vectores pHT315 con cada uno de los promotores, se llevó a cabo una digestión con enzimas de restricción digiriendo 2,000 ng de DNA plasmídico con las enzimas *NcoI* y *SmaI* (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) para liberar el gen X (**figura 18**) e insertar el gen *cryIAcMod*; se añadieron 3 y 3.5  $\mu$ L respectivamente a 25°C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de digestión se desactivaron las enzimas a 65°C por 20 minutos.



**Figura 18. Representación de los vectores pHT315 con las versiones del promotor *cry3A*.** Se indican con flechas la región que se elimina digiriendo con las enzimas de restricción *NcoI* y *SmaI* en donde posteriormente se clonó el gen *cryIAcMod*.

La digestión de DNA se corrió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio 0.04% a 100 V durante 50 minutos. Posteriormente, se cortó la rebanada de gel con la fracción de DNA de interés y se purificó mediante el kit comercial *MinElute Gel extraction kit* (QIAGEN, Valencia, CA). Para cuantificar la concentración de DNA se utilizó un equipo espectrofotométrico *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

### 6.9 Clonación del producto de PCR del gen *cryIacMod* en el vector pJET 1.2

La enzima *Accuprime* (Invitrogen vía Life Technologies, Grand Island, NY) genera un producto con extremos romos, el cual se purificó con el kit *MinElute PCR purification kit* (QIAGEN, Valencia, CA). Posteriormente se clonó en el vector pJET 1.2 (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) en una proporción molar de 1:3 (vector/inserto).

Reactivo	$\mu\text{L}$
1. DNA Vector pJET 1.2 (50 ng)	1
2. DNA Inserto (200 ng)	2
3. Buffer Ligasa T4 10X	2
4. DNA <i>Ligasa T4</i>	1
5. H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	14
<b>Volumen final</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>

\* La ligación se incubó toda la noche a 16°C.

La enzima *DNA Ligasa T4* (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) se inactivó a 65°C durante 10 minutos y se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  para transformar en células de *E. coli* MC1061.

### 6.10 Ligaciones del gen *cryIAcMod* con los vectores pHT315 portadores de los diferentes promotores

Con la finalidad de obtener el gen *cryIAcMod* bajo cada versión de promotor *cry3A* (A, B y C) se ligaron los fragmentos de DNA con la enzima *DNA ligasa T4* (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) y su buffer correspondiente. Las mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  y se incubaron a 16°C durante toda la noche.

Reactivo	$\mu\text{L}$
DNA Vector pHT315	100 ng
DNA Inserto	172 ng
Buffer Ligasa T4 10X	2
Ligasa T4	1
H <sub>2</sub> O	a 20 $\mu\text{L}$
<b>Volumen final</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>

Se incluyeron los siguientes controles para facilitar la discriminación de clonas positivas en cada transformación en *E. coli*:

**a)** Ligado sobre sí mismo: este control indica la proporción de DNA que no digirió correctamente. Contiene el plásmido pHT315 (con el promotor *procry3A/A*, B o C) digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *SmaI* (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA), buffer ligasa, DNA ligasa T4 (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) y agua libre de nucleasas.

**b)** Sin ligar: este control indica la proporción de DNA que no se digirió durante la reacción enzimática. Contiene el plásmido pHT315 (con el promotor *procry3A/A*, B o C) digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *SmaI* (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA), buffer ligasa y agua libre de nucleasas.

## **6.11 Transformación de células electrocompetentes mediante pulso eléctrico (electroporación)**

### **a) Células de *E. coli* MC1061**

Se utilizaron alícuotas con células de *E. coli* MC1061 electrocompetentes para transformarlas con el DNA plasmídico de interés. Las células almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  fueron descongeladas en hielo. Se adicionaron  $2\ \mu\text{L}$  de ligación a cada alícuota de bacterias de *E. coli* MC1061 electrocompetentes y se transfirieron a celdas *Gene Pulser Cuvette* de  $0.1\ \text{cm}$  (Bio-Rad vía Life Science Research, Hercules, CA). Se sometieron a un pulso eléctrico de  $1.6\ \text{V}$ ,  $200\ \Omega$  y  $25\ \mu\text{FD}$  en un equipo Gene Pulser (Bio-Rad vía Life Science Research, Hercules, CA). Las células fueron suspendidas en  $450\ \text{mL}$  de medio LB líquido y transferidas a tubos de pp estériles de  $1.5\ \text{mL}$  para ser puestas en recuperación durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y con agitación de  $200\ \text{rpm}$ .

Las bacterias transformadas fueron sembradas en volúmenes de  $200$  y  $250\ \mu\text{L}$  mediante dispersión con perlas estériles, en placas de medio LB sólido suplementado con ampicilina ( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

### **b) Células de células de Bt 407 cry**

Se utilizó la cepa acristalífera 407 cry- de Bt para electroporación. Se adicionaron  $3$  a  $5\ \mu\text{g}$  de DNA plasmídico, purificado a partir de células de *E. coli* MC1061, a cada alícuota de células de Bt electrocompetentes, se dejaron en hielo  $5$  minutos y se transfirieron a celdas *Gene Pulser Cuvette* de  $0.4\ \text{cm}$  (Bio-Rad vía Life Science Research, Hercules, CA).

Se sometieron a un pulso eléctrico de  $2.5\ \text{V}$ ,  $1000\ \Omega$  y  $25\ \mu\text{FD}$  en un equipo *Gene Pulser* (Bio-Rad vía Life Science Research, Hercules, CA). Después del pulso eléctrico, se adicionaron  $500\ \mu\text{L}$  de BHI y se recuperaron a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación de  $200\ \text{rpm}$  durante una hora. Las células se sembraron en placas de medio LB sólido con eritromicina ( $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) con  $100\ \mu\text{L}$  de la suspensión de bacterias, dispersada con perlas estériles y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante toda una noche. Como control negativo de electroporación se utilizó una alícuota de células sin que se adicionara DNA plasmídico.

## **6.12 PCR de colonia**

### **a) Protocolo para células de *E. coli***

Para realizar la selección de colonias transformadas con el plásmido deseado, se realizó PCR de colonia a partir de una suspensión celular de cada colonia en  $30\ \mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, posteriormente se colocaron en un baño de agua en ebullición durante  $5$  minutos y se tomaron  $3\ \mu\text{L}$  como templado. Las condiciones de reacción de PCR se muestran a continuación:

Reactivo	$\mu\text{L}$
1. Buffer Taq 10X	2
2. $\text{MgCl}_2$ 50 mM	2
3. dNTP's 10 mM	0.25
4. Oligo F * 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0.4
5. Oligo R alfa5r 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0.4
6. Templado de DNA	3
7. Enzima Taq DNA polimerasa	0.2
8. $\text{H}_2\text{O}$ libre de nucleasas	11.75
<b>Volumen final</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>

\*El oligo *forward* utilizado corresponde a la versión del promotor *cry3A* bajo el cual se encuentra el gen *cry1AcMod*.

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

95°C	5 minutos	Un ciclo
95°C	30 segundos	} 30 ciclos
55°C	30 segundos	
72°C	2 minutos	
72°C	10 minutos	Un ciclo

Se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  posterior a la amplificación de DNA para analizarlos en un gel de agarosa al 1% con 0.04% de bromuro de etidio (10 mg/mL).

#### **b) Protocolo para células de Bt**

Para corroborar la presencia del plásmido deseado en las células de Bt transformadas se realizaron PCR de colonia. Se estriaron las bacterias de cada colonia en una placa de LB con eritromicina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó por un período de 4 a 5 horas a 30°C o hasta ver un leve crecimiento de colonias transparentes. Se tomó un inóculo de la placa y se mezcló en 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas en un tubo de pp estéril de 0.5 mL. Las muestras se

colocaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , al día siguiente se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos para finalmente ser puestas en hielo.

Las condiciones de reacción, para un volumen final de  $25\ \mu\text{L}$ , se muestran a continuación:

Reactivo	$\mu\text{L}$
1. Buffer Taq 10X	2.5
2. $\text{MgCl}_2$ 50 mM	2.5
3. dNTP's 10 mM	0.25
4. Oligo F * 10 pmol/ $\mu\text{L}$	1
5. Oligo R alfa5r 10 pmol/ $\mu\text{L}$	1
6. Templado de DNA	5
7. Enzima Taq DNA polimerasa	0.2
8. $\text{H}_2\text{O}$ libre de nucleasas	12.55
<b>Volumen final</b>	<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>

\*El oligo *forward* utilizado corresponde a la versión del promotor *cry3A* bajo el cual se encuentra el gen *cryIAcMod*.

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

94°C	5 minutos	Un ciclo
94°C	30 segundos	} 30 ciclos
55°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	Un ciclo

Se corrieron  $10\ \mu\text{L}$  posterior a la amplificación en un gel de agarosa al 1% para ser analizado.

### **6.13 Secuenciación de DNA**

A partir de los plásmidos purificados con el kit *QIAGEN* mencionado, se realizó la secuenciación del DNA en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los resultados fueron analizados a partir de los datos mostrados en el programa BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA); es un programa informático que permite analizar las secuencias de DNA. Los resultados se compararon mediante *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; NIH, Montgomery, Md); es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local de DNA, RNA o de proteínas.

### **6.14 Obtención de la suspensión de spora-cristal**

Las cepas de Bt transformadas con las construcciones realizadas fueron sembradas en placas con medio HCT sólido con eritromicina (10 µg/mL) y se incubaron a 30°C durante 3 días para favorecer la esporulación de las bacterias y la formación de cristales de proteína. Mediante revisión al microscopio óptico con un objetivo de 100X, se detectó si las bacterias esporuladas producían los cristales bipiramidales típicos de Cry1A. La biomasa de cada placa de Petri fue colectada, mediante raspado, en un tubo de pp estéril de 1.5 mL con agua más PMSF 1mM. Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta el momento de ser utilizadas en bioensayos o electroforesis y durante los experimentos fueron mantenidas en hielo.

### **6.15 Cuantificación de proteínas**

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) para cuantificar la proteína total. Se tomó una alícuota de la muestra (por ejemplo: spora-cristal) y se aforó a 800 µL con agua destilada; se adicionaron 200 µL del reactivo de *Bradford* (Bio-Rad Protein Assay, vía Life Science Research, Hercules, CA), se agitó la muestra y se incubó la reacción por cinco minutos. La absorbancia de las muestras fue determinada en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) en la longitud de onda de 595 nm. La concentración fue calculada a partir de una curva patrón realizada con albúmina sérica bovina (BSA).

### **6.16 Electroforesis de proteínas**

Las muestras de spora-cristal fueron sometidas a ensayos de electroforesis utilizando geles de acrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. Las muestras fueron adicionadas con mezcla lítica 4X y hervidas en baño maría por 5 minutos. La electroforesis se realizó en cámaras *Tall mighty smal* (Hoefer Scientific Instruments, Holliston, MA) con buffer de corrida TAE 1X. Se cargaron en el gel y se aplicaron 10 mA hasta que el frente de corrida llegó al separador, posteriormente se aplicaron 20 mA hasta que el frente de corrida salía del gel. El gel se enjuagó con agua destilada tres veces durante 5 minutos cambiando el

agua cada vez y se tiñó con el colorante Coomassie Bradford (Bio-Rad Protein Assay, vía Life Science Research, Hercules, CA) hasta observar bandas.

### **6.17 Bioensayos de toxicidad en larvas de primer estadio de *M. sexta***

Se realizaron utilizando larvas de *M. sexta*, en su primer estadio de crecimiento, colocadas en placas de 24 pozos y una dieta artificial (una larva por pozo). El área de cada pozo fue de 2 cm<sup>2</sup> en los cuales se distribuyó una porción de la dieta que representaba la mitad de la capacidad del pozo. La dieta fue adicionada con tetraciclina y metilparabeno para evitar la contaminación por microorganismos.

Se utilizaron varias concentraciones de cada proteína como espora-cristal. Las concentraciones aplicadas fueron 1, 100, 500, 1000, 2000 y 3000 ng/cm<sup>2</sup>. Cada placa tuvo la misma concentración en sus 24 pozos mediante la adición de 35 µL en los pozos, se dejaron secar completamente para después colocar las larvas. Las placas fueron cubiertas con plástico adherente y la tapa de la placa para ser mantenidas durante 7 días a temperatura ambiente, con ciclos de luz y oscuridad propios del día y la noche y con humedad ambiental.

Después de los 7 días se cuantificó el número de larvas muertas y se determinó el porcentaje de mortandad. Se utilizó agua esterilizada para una placa de control negativo y el mismo rango de concentración de las proteínas Cry1AcMod bajo el promotor BtI/BtII y Cry1Ac silvestre como controles positivos y como control negativo agua.

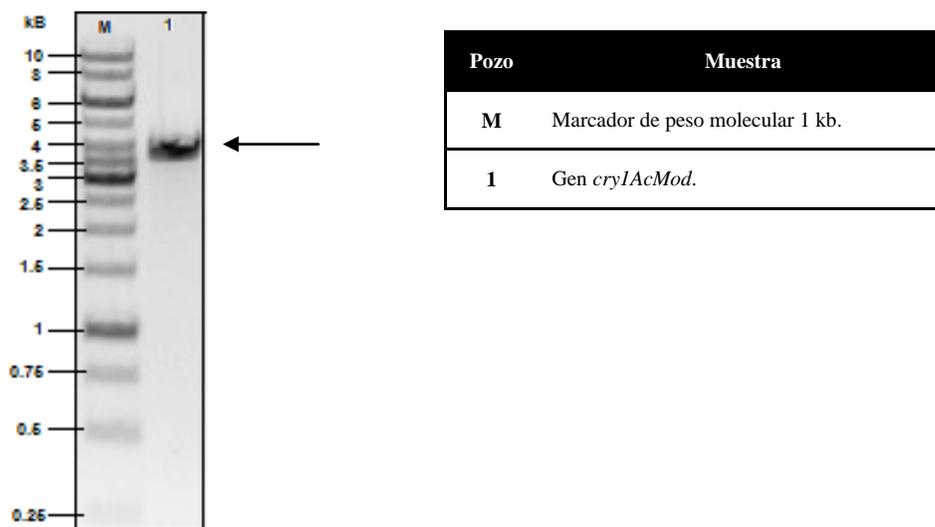
## 7. RESULTADOS

---

### 7.1 Obtención del gen *cryIAcMod* bajo el promotor *cry3A*: *procry3A/A*, *procry3A/B* y *procry3A/C* en el vector pHT315

#### 7.1.1 Amplificación del gen *cryIAcMod*

En la **figura 19** se muestra el resultado de la amplificación del gen *cryIAcMod*; se tomó una alícuota de la muestra y se corrió en un gel de agarosa al 1% para corroborar que se haya obtenido el producto con el tamaño esperado y que no haya amplificado productos inespecíficos. Posteriormente se pasó por una columna para purificar productos de PCR y de esta manera obtener el DNA limpio y proceder a su cuantificación.

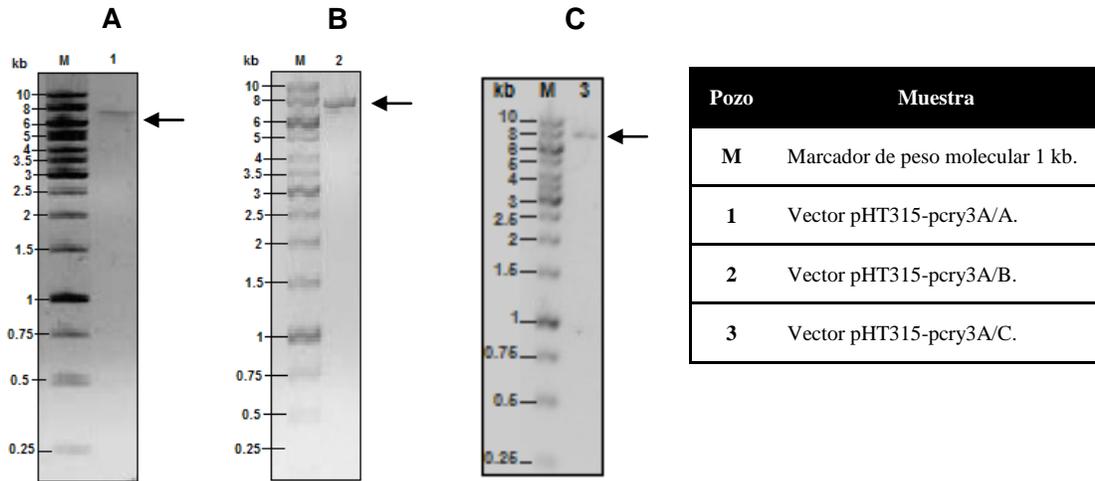


**Figura 19.** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt que muestra la amplificación del gen completo *cryIAcMod*. Se utilizaron los oligos: 5' 1AcMod y 3'1AcModTer reverso, el tamaño esperado es de 3.756 kb.

Posteriormente, se clonó el gen *cryIAcMod* en el vector pJET 1.2 y se digirió con las enzimas *NcoI* y *SmaI* para obtener el fragmento de DNA con los sitios disponibles para realizar la sub-clonación.

### 7.1.2 Purificación de bandas que contienen el vector pHT315 con el promotor *cry3A*

Por otra parte, se realizó una digestión doble con las enzimas de restricción *NcoI* y *SmaI* a los vectores *pHT315-pcry3A/A*, *pHT315-pcry3A/B* y *pHT315-pcry3A/C* para purificar las bandas del gel de agarosa, las cuales se observan en la **figura 20**.



**Figura 20.** Geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt que muestra las bandas purificadas. (A) vector pHT315-pcry3A/A (B) vector pHT315-pcry3A/B y (C) vector pHT315-pcry3A/C.

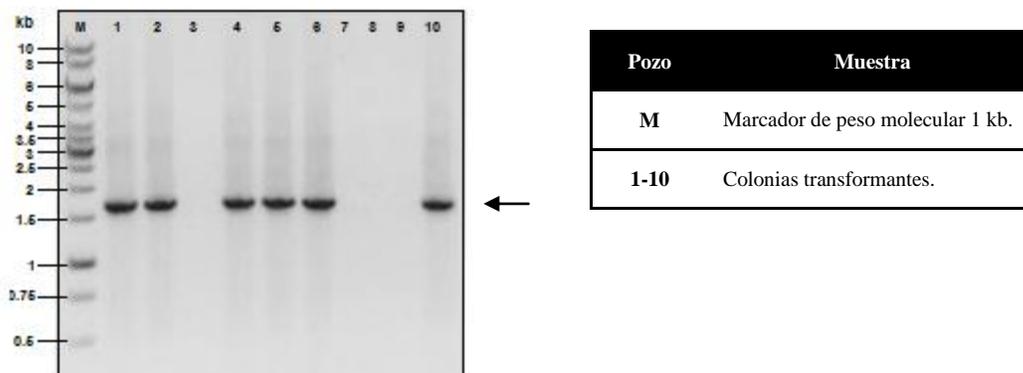
Cada vector pHT315 con el promotor *cry3A* se ligó con el gen *cryIacMod* en los sitios *NcoI* y *SmaI*, para transformarlo en células electrocompetentes de *E. coli* MC1061.

### 7.1.3 Análisis de colonias transformantes por PCR

Con la finalidad de corroborar la inserción del gen *cryIacMod* en cada uno de los tres vectores pHT315-pcry3A en las colonias de *E. coli* transformantes, se realizó un PCR de colonia utilizando como templado el DNA de algunas de las colonias (de manera independiente c/u), los resultados se muestran a continuación:

### 7.1.3.1 Cry1AcMod bajo el promotor *cry3A/A*

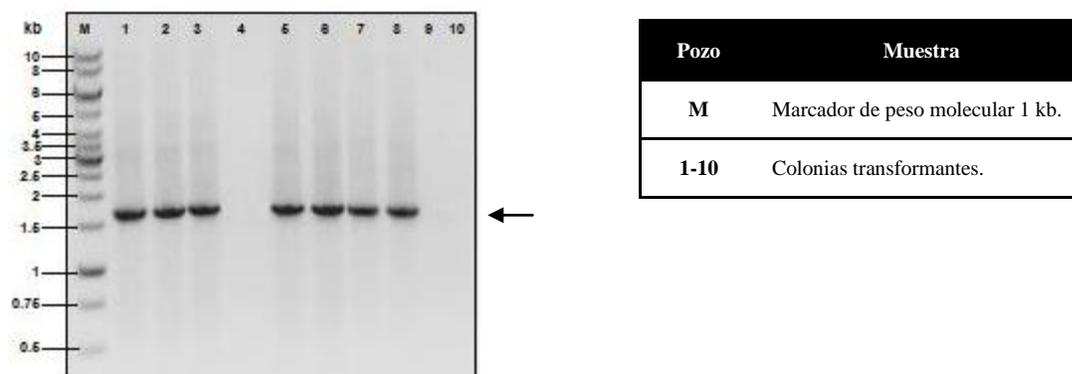
En la **figura 21** se observa el resultado del PCR de colonia correspondiente a la construcción del vector pHT315-pcry3A/A más el gen *cry1AcMod* de 10 colonias transformantes. Se utilizaron los oligos: 5' procry3A/A y 3' N-terR. El tamaño esperado era de 1.6 kb.



**Figura 21.** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt que muestra las colonias positivas de la transformación del vector pHT315-pcry3A/A más el gen *cry1AcMod*.

### 7.1.3.2 Cry1AcMod bajo el promotor *cry3A/B*

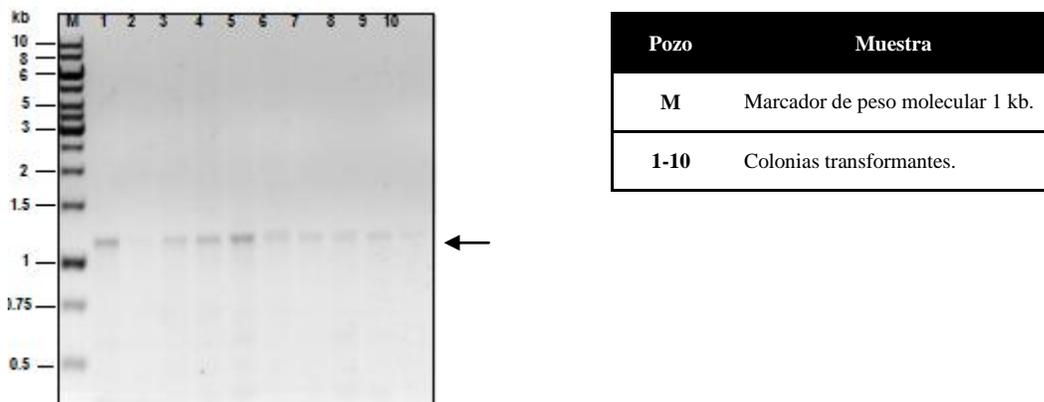
En la **figura 22** se observa el resultado del PCR de colonia correspondiente a la construcción del vector pHT315-pcry3A/B más el gen *cry1AcMod* de 10 colonias transformantes. Se utilizaron los oligos: 5' procry3A/B y 3' N-terR. El tamaño esperado era de 1.56 kb.



**Figura 22.** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt que muestra las colonias positivas de la transformación del vector pHT315-pcry3A/B más el gen *cry1AcMod*.

### 7.1.3.3 Cry1AcMod bajo el promotor *cry3A/C*

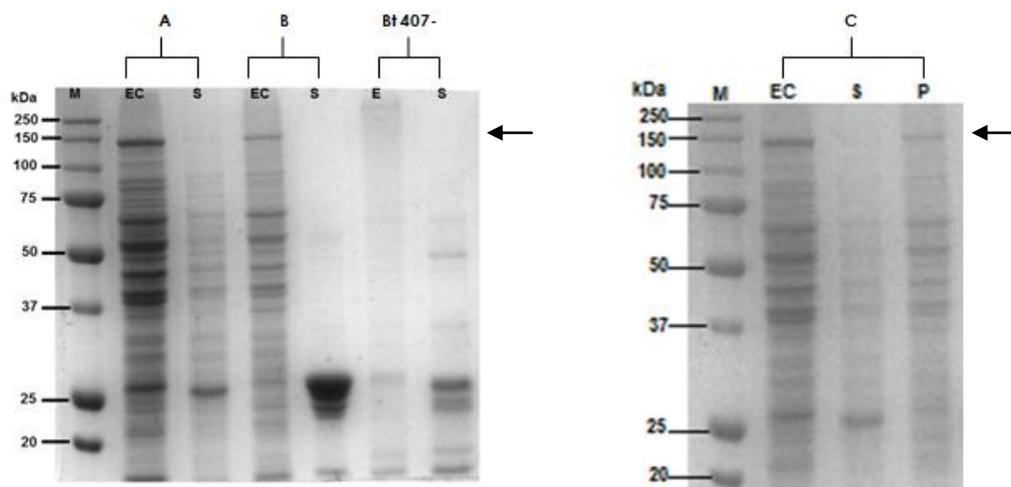
En la **figura 23** se observa el resultado del PCR de colonia correspondiente a la construcción del vector pHT315-*pcry3A/C* más el gen *cry1AcMod* de 10 colonias transformantes. Se utilizaron los oligos: 5' *procry3A/C* y 3' N-*terR*. El tamaño esperado era de 1.4 kb.



**Figura 23.** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt que muestra las colonias positivas de la transformación del vector pHT315-*pcry3A/C* más el gen *cry1AcMod*.

### 7.2 Expresión del gen *cry1AcMod* bajo el promotor *cry3A / A, B, C* en Bt y solubilización

Posterior a la sección de clonas en *E. coli* que contuvieran los plásmidos de interés se llevó a cabo la transformación de DNA plasmídico en células acristalíferas de Bt. Las colonias positivas se seleccionaron mediante un PCR en colonia y se evaluó la producción de proteína mediante SDS-PAGE confirmando que las tres construcciones expresan la protoxina Cry1AcMod con un peso molecular de 130 kDa. También se evaluó la solubilidad de cada proteína en un amortiguador de carbonatos 100 mM pH 10.5, 0.02%  $\beta$ -mercaptoetanol, que simula las condiciones que se encuentran presentes en el intestino de lepidópteros, encontrando que todas las construcciones son insolubles en esta condición (**figura 24**).



**Figura 24. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de las proteínas Cry1AcMod.** Las letras A, B y C indican la construcción Cry1AcMod pHT315-pcry3A/A, pHT315-pcry3A/B y pHT315-pcry3A/C, respectivamente. Bt 407- es la cepa acristalífera. EC= Espora-Cristal, S= Fracción soluble y P= Pastilla.

### 7.3 Bioensayos en larvas de *M. sexta*

Para determinar la actividad biológica de las construcciones Cry1AcMod se realizaron bioensayos contra larvas de *M. sexta* encontrando que ninguna de las tres construcciones resultó tóxica, evaluando un rango desde 1 hasta 5,000 ng/cm<sup>2</sup> (**tabla 1**). Se incluyeron como controles positivos la espora-cristal de la toxina Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod original (promotor BtI/BtII). Los datos se analizaron mediante un análisis PROBIT utilizando el programa POLO PLUS para obtener la LC<sub>50</sub>.

Toxina	LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )
1. Cry1Ac silvestre	0.3 (0.2-0.4)
2. Cry1AcMod original	3.7 (2.9-4.5)
3. Cry1AcMod-pcry3A/A	> 5000
4. Cry1AcMod-pcry3A/B	> 5000
5. Cry1AcMod-pcry3A/C	> 5000

**Tabla 1. Resultado de los bioensayos contra larvas de *M. sexta*.** Se incluyen los controles positivos: Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod original. Intervalo de confianza al 95%.

## 8. DISCUSIÓN

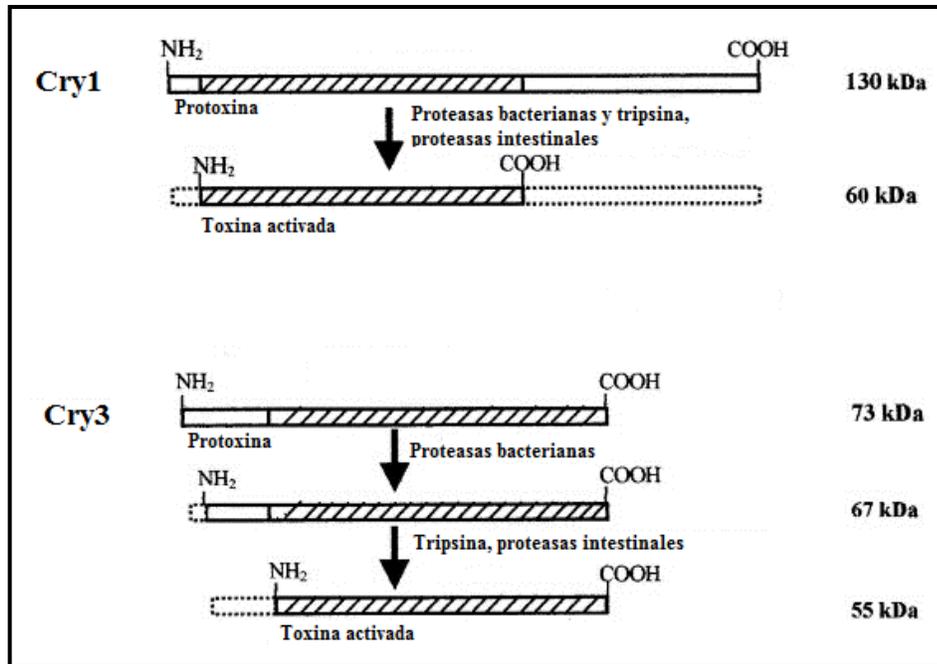
---

El principal obstáculo para la eficacia a largo plazo de las toxinas Cry es la evolución de resistencia en las plagas de insectos (Gahan *et al.*, 2001, Tabashnik 1994). Las toxinas Cry1A reconocen el dominio extracelular de proteínas tipo caderina que atraviesan la membrana celular del intestino medio de las larvas de insectos (Vadlamudi *et al.*, 1995). La alteración de la interacción de la toxina Bt con los receptores del intestino medio es el mecanismo de resistencia más común en insectos (Ferré *et al.*, 2002).

La obtención de las toxinas Cry1AcMod que son capaces de formar oligómero y ser tóxicas contra insectos resistentes (Soberón *et al.*, 2007), generó la posibilidad de nuevos planteamientos para la producción de una nueva generación de toxinas Cry modificadas que sean capaces de contender contra el desarrollo de resistencia en las plagas de importancia agrícola, desafortunadamente no se ha podido determinar la eficacia de dichas variantes Cry1AMod.

En el presente trabajo se propuso la expresión de la proteína Cry1AcMod bajo la regulación del promotor *cry3A*. Una vez que se obtuvieron las muestras de interés, mediante SDS-PAGE se encontró que este promotor es funcional en sus tres versiones (A,B y C), ya que se observó la producción de la proteína Cry1AcMod. Sin embargo, estas proteínas no son tóxicas contra el lepidóptero *M. sexta* y se corroboró que son insolubles en pH alcalino. Du y col. en 1994 reportaron que la solubilidad de las inclusiones cristalinas y la toxicidad se encuentran estrechamente relacionadas, se sugiere que los residuos de cisteína en la protoxina están involucrados en la cristalización de las proteínas Cry de 130 kDa (Agaisse *et al.*, 1995; Du *et al.*, 1994). Una porción del extremo C-terminal de las protoxinas contiene residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro en las inclusiones cristalinas y por consiguiente la reducción de estos enlaces es un paso limitante en la solubilidad de las protoxinas.

Continuando con este análisis, se tiene reportado que la estructura de la toxina Cry3A es casi idéntica a la toxina activa contra lepidópteros Cry1A (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995); sin embargo, sólo comparten un 36% de identidad en secuencia de aminoácidos. Ambas proteínas se sintetizan como protoxinas, pero difieren en que la protoxina Cry3A carece de la mitad del extremo carboxilo terminal que presenta Cry1A el cual es rico en residuos de cisteína (**figura 25**).



**Figura 25. Comparación en peso molecular y activación de las toxinas Cry1y Cry3.** Las toxinas Cry1A son proteínas de 130 kDa que son procesadas por proteasas liberando un fragmento tóxico de 60 kDa. En contraste con las toxinas Cry3A que son de 73 kDa y cuando son procesadas liberan un fragmento tóxico de 55 kDa (modificada de Rukmini *et al.*, 2000).

El alto pH y las condiciones reductoras que se encuentran en los intestinos de larvas de lepidópteros y dípteros es importante para reducir los enlaces disulfuro intramoleculares en la protoxina Cry1A y la solubilización. En contraste, la protoxina Cry3A se encuentra empaquetada principalmente por interacciones iónicas en inclusiones, las cuales se solubilizan en pH 7-8 en ausencia de mercaptano (Bernhard, 1986). Estas condiciones de solubilización se encuentran en intestinos medios de larvas de coleópteros.

El citoplasma bacteriano generalmente es reductor, sin embargo, durante la fase de esporulación el ambiente intracelular comienza a ser más oxidativo (Setlow y Setlow, 1971). La ausencia de enlaces disulfuro en inclusiones Cry3A indica que el plegamiento no depende de un ambiente más oxidante, la síntesis de esta protoxina comienza al final del crecimiento exponencial, en contraste con las toxinas Cry1A que sí presentan enlaces disulfuro.

Los resultados de solubilidad y toxicidad sugieren que no se están formando de manera adecuada los enlaces disulfuro en la proteína Cry1AcMod bajo la regulación del promotor *cry3A*. Debido a que no se cuenta con la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Ac, se realizó un análisis *in silico* con el programa *DiANNA 1.1 web server* que predice la formación de enlaces disulfuro, encontrando que los residuos de cisteína 10 y 15

que no se encuentran en la toxina Cry1AcMod estarían formando enlaces disulfuro con residuos que se encuentran en el extremo C-terminal, específicamente 10-654 y 15-729 (figuras 26 y 27).

Step 5: Weighted matching	
Predicted bonds	
10 - 654	PNINECIPYNC - SNLVECLSDEF
15 - 729	CIPYNCLSNPE - GTFDECYPTYL
660 - 795	LSDEFCLDEKK - SPIGKCAHSH
810 - 1036	DIDVGCTDLNE - LKFSNCVEEEV
963 - 1018	NNGLSCWNVKG - GYGEGCVTIHE
998 - 1102	QEVRCVCPGRGY - RRDNPCEENRG

Figura 26. Resultado del análisis *in silico* de la formación de enlaces disulfuro en la proteína Cry1AcMod.

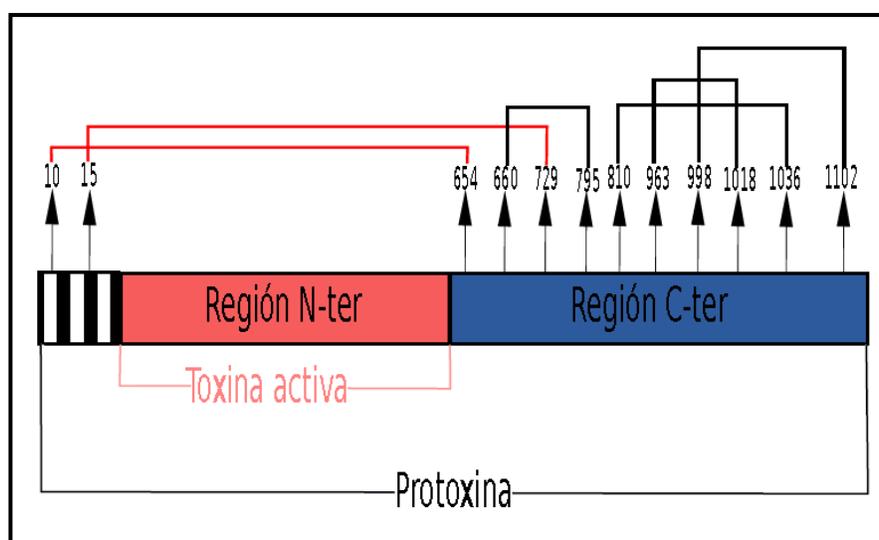


Figura 27. Representación esquemática de la probable formación de enlaces disulfuro en la proteína Cry1AcMod. En barras negras y blancas se señala la porción de la cual carece la proteína Cry1AcMod en contraste con la proteína Cry1Ac silvestre. En color naranja está la región N-terminal y en color azul la región C-terminal. Con líneas color naranja se señala la porción correspondiente a la forma activa de la toxina y en color negro la región de protoxina. Con flechas se ubican los residuos de cisteína, las líneas rojas indican los enlaces disulfuro que se están afectando y en color negro los enlaces disulfuro que permanecen en la proteína Cry1AcMod.

Estos resultados reflejan que se puede estar generando un plegamiento en la proteína que no es funcional y que ocasiona que se formen agregados entre las proteínas y por lo tanto las proteínas son insolubles y no presentan toxicidad. Por lo tanto, este sistema no resultó ser óptimo para la producción de futuras versiones de la proteína Cry1AcMod ya que no presentan actividad biológica.

## 9. CONCLUSIONES

---

- Se obtuvieron de manera exitosa las construcciones del gen *cry1AcMod* bajo las tres versiones del promotor *cry3Aa*.
- Las tres versiones de este promotor resultaron ser funcionales, ya que permiten la expresión de las proteínas en el peso esperado en Bt.
- Las proteínas producidas no presentan actividad biológica contra larvas de *M. sexta* y son insolubles en pH alcalino.
- Este sistema no resulta ser óptimo para la expresión de otras toxinas Cry1AMod.

## 10. PERSPECTIVAS

---

- Realizar mutagénesis sitio dirigida en los residuos cisteína 654 y 729 de la proteína Cry1AcMod bajo la regulación del promotor *cry3A* y evaluar su solubilidad.
- Expresar la proteína Cry1AcMod bajo la regulación de otros promotores Cry, por ejemplo el promotor de la toxina Cyt1A.

## 11. APENDICE

---

### I. Medios de cultivo

#### **Medio LB**

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Peptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	10.0

Disolver los componentes con agitación y aforar a 1L de medio con agua destilada. Para medio sólido agregar 15 g de agar.

Esterilizar en autoclave.

#### **Medio BHI**

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Polvo de la infusión cerebro-corazón	37

Disolver componente con agitación y aforar a 1L de medio con agua destilada. Para medio sólido agregar 15 g de agar.

Esterilizar en autoclave.

#### **Medio HCT**

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Triptona	2.5
Cas-aminoácidos	1.0

Disolver los componentes con agitación y aforar a 446 mL de medio con agua destilada.

Ajustar pH a 7.25 con KOH.

Para medio sólido agregar 7.5 g de agar.

Esterilizar en autoclave.

- Se preparan también las siguientes soluciones y se esterilizan en autoclave:

Solución I:

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
-------------------	---------------

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6.8
--------------------------	-----

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución II:

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
-------------------	---------------

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.23
---	------

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.017
--	-------

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.14
---	------

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución III:

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
-------------------	---------------

$\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
--	-----

$\text{H}_2\text{SO}_4$ (IN)	10.0 mL
------------------------------	---------

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución IV:

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
-------------------	---------------

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.47
---	------

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución de glucosa al 10%

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
-------------------	---------------

Dextrosa	10.0
----------	------

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Al momento de utilizar el medio, a una temperatura soportable por el dorso de la mano, se adicionan las soluciones (previamente esterilizadas en autoclave):

Solución	mL
I	25.0
II	0.5
III	5.0
IV	5.0
Glucosa 10%	15.0

## II. Buffers

### **TBE 10X**

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Tris	108.0
Ácido bórico	55.0
EDTA (0.5 M, pH 8)	40.0 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L con agua destilada.

Filtrar con filtro de 0.45  $\mu$ m

### **TAE 50X**

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Tris	242.0
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA (0.5 M, pH 8)	100 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L con agua destilada.

Filtrar con filtro de 0.45  $\mu$ m

### **Buffer de corrida 10X (geles de acrilamida)**

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Glicina	144.0
Tris	30.0
SDS al 10%	10.0

Disolver componentes con agitación y aforar a 1 L con agua destilada.

### **PBS 10X**

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	26.4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	47.2
NaCl	58.4

Disolver componentes con agitación, ajustar el pH a 7.2 con NaOH 5 M y aforar a 1 L con agua destilada.

Filtrar con un filtro de 0.45 µm.

### **Buffer EB (para preparar células de *Bt* electrocompetentes)**

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Sacarosa	64.2
MgCl <sub>2</sub>	0.1

Disolver componentes con agitación y aforar a 300 mL con agua destilada.  
Esterilizar en autoclave.

### III. Otros materiales utilizados

#### **Ampicilina (100 mg/mL)**

En condiciones de esterilidad:

Disolver 1g de ampicilina en 10 mL de agua estéril.

Filtrar con un filtro de 0.22 µm.

Almacenar en congelación hasta su uso.

**Eritromicina (10 mg/mL)**

En condiciones de esterilidad:

Disolver 0.1g de eritromicina en 5 mL de agua estéril con 5 mL de etanol absoluto.

Filtrar con un filtro de 0.22 µm.

Almacenar en congelación hasta su uso.

**Mezcla lítica 4X (10 mL)**

Componente	gramos
Glicerol	4.0 mL
Tris (0.5 M, pH 6.8)	5.0 mL
SDS	0.4
2-mercapto etanol	1.0 mL

Adicionar azul de bromofenol con la punta de un palillo y mezclar.

Almacenar en congelación hasta su uso.

## 12. REFERENCIAS

---

### A

Agaisse, H. y Lereclus, D. 1994. **Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIII<sub>A</sub> toxin gene is not dependent on a sporulation specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant.** *J Bacteriol.* 176, 4734–4741.

Agaisse, H y Lereclus, D. 1996. **STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability.** *Mol Microbiol.* 20:633-43.

Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O.A., Kolsto, A. B., Lereclus, D.,1999. **PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*.** *Mol. Microbiol.* 32, 1043-1053.

Armengol G, Escobar M.E, Maldonado y Orduz S. 2006. **Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects.** *Journal of Applied Microbiology.* 102: 77–88.

Aronson, A.L., Shai. Y., 2001. **Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action.** *FEMS. Microbiol. Lett.* 195, 1-8.

Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, Narukawa J, Kawai S, Sezutsu H, Kobayashi I, Uchino K, Tamura T, Mita K, Kadono-Okuda K, Wada S, Kanda K, Goldsmith MR, Noda H. 2012. **Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences current issue.* 109 (25): doi:10.1073/pnas.1120698109

Audtho, M., Valaitis, A.P., Alzate, O., Dean, D.H., 1999. **Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1  $\delta$ -endotoxin by protein engineering.** *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4601-4605.

### B

Baxter, S.W. Zhao, J.Z., Gahan, L.J, Shelton, A.M., Tabashnik, B.E., *et al.*, 2005. **Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt in *Plutella xylostella*.** *Insect Mol. Biol.* 14, 327–334.

Baxter, S.W. Zhao, J.Z., Shelton, A.M., Vogel, H., Heckel, D.G., 2008. **Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 125–135.

Bechtel, D.B. y Bulla, L.A. 1982. **Ultrastructural analysis of membrane development during *Bacillus thuringiensis* sporulation.** *J Ultrastruct Res.* 79:121-32.

Belfiore, C.J., Vadlamudi, R.K., Osman Y.A., Bulla, L.A. Jr., 1994. **A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 359-364.

Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D. J. Ellis, G. M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers, and H. D. Burges. 1997. **Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests.** *J. Invertebr. Pathol.* 70: 59-68.

Bhalla, R., Dalal, M., Panguluri, S.K., Jagadish, B., Mandaokar, A.D., Singh, A.K. and Kumar, P.A. 2005. **Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*.** *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 467–472

Bosch, D., Schipper, B., van der Kleij, H., de Maagd, R.A., Stiekema, J., 1994. **Recombinant *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins with new properties for resistance management.** *Biotechnology.* 12, 915-918.

Bravo, A., 1997. **Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin family proteins and their functional domains.** *J. Bacteriol.* 179, 2793-2801.

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

Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz, G.C, Sánchez, J., *et al.*, 2004. **Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains.** *Biochem. Biophys. Acta.* 1667:38-46.

Bravo, A., Gill, S.S, Soberón, M., 2007. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** *Toxicon.* 49, 423–435.

Bravo, A. y Soberón, M. 2008. **How to cope with insect resistance to Bt toxins?.** *Trends in Biotechnology.* 26 (10): 573-579.

Bravo, A., Soberón, M., Gill, S.S. 2010. ***Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use.** En: Insect control. *Elsevier.* 247-259.

Bulla, L., Bechtel, D., Kramer, K., Shethna, Y., Aronson, A., *et al.*, 1980. **Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*.** *Crit Rev Microbiol.* 8:147-204.

## C

Carrier, M.F. 1990. **Actin polymerization and ATP hidrolysis.** *Adv. Biophys.* 26, 51–73.

Chaoyin, Y., Wei, S., Sun, M., Lin, L., Faju1, C., Zhengquan, H. Ziniu Y. 2007. **Comparative study on effect of different promoters on expression of *cryIAc* in *Bacillus thuringiensis* chromosome.** *J. Appl. Microbiol* 103: 454–461.

Chaufaux, J., M. Marchal, N. Gilois, I. Jehanno, and C. Buisson. 1997. **Investigation of natural strains of *Bacillus thuringiensis* in different biotopes throughout the world.** *Can. J. Microbiol.* 43: 337-343.

Chitkowski, R.L. Turnipseed, S. G., Sullivan, M. J., Bridges W. C. Jr., 2003. **Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests.** *J. Econ. Entomol.* 96, 755–762.

Choma, C.T., Surewicz, W.K., Carey, P.R., Pozgay, M., Raynor, T., *et al.*, 1990. **Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*: structural implications.** *Eur. J. Biochem.* 189, 523-527.

Cooper, M.A., Carroll, J., Travis, E., Williams, D.H., Ellar, D.J., 1998. ***Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane envionment.** *Biochem. J.* 333, 677-683.

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

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D. 2002. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)

## D

Dai, S.M., Gill, S.S., 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 273-283.

Dankocsik C., Donovan W., Jany S. 1990. Activation of a cryptic cristal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the cristal protein insecticidal specificity. *Mol.Microbiol.* 4(12):2087-2094.

de Maagd, R.A., Weemen-Hendriks, M. Stiekema, W., Bosch, D., 2000. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specific determinant for *Spodoptera exigua* in different, but no all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.* 66,1559-1563.

de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has envolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193-199.

de Maagd R.A, Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet.* 37:409-433.

Denolf, P., Hendrickx, K., VanDamme, J., Jansens, S., Peferoen, M. *et al.*, 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-biding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248, 748-761.

Dorsch, J.A., Candas, M., Griko, N.B., Maaty, W.S.A., Midbo, E.G., *et al.*, 2002. Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a región adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of Bt-R1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1025-1036.

Doss, V.A., Kumar, K.A., Jayakumar, R. and Sekar, V. 2002. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 26, 82-88

Dow, J.A.T., 1986. **Insect midgut function.** *Adv. Insect Physiol.* 19,187-238.

Dubois, N.R., Dean, D.H., 1995. **Synergism between Cry1A insecticidal cristal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae.** *Environ. Entomol.* 24, 1741-1747.

Du, C., Martin, A.W., Nickerson, K.W., 1994. **Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals.** *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3847-3853.

## E

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

## F

Federeci y Bauer, 1998. **Cyt1Aa Protein of *Bacillus thuringiensis* Is Toxic to the Cottonwood Leaf Beetle, *Chrysomela scripta*, and Suppresses High Levels of Resistance to Cry3A.** *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11): 4368-4371.

Fedhila, S., Nel, P., Lereclus, D., 2002. **The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route.** *J. Bacteriol.* 184, 3296-3304.

Ferré, J., Van Rie, J., 2002. **Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*.** *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533.

Franklin, M. T. *et al.* 2009. **Modified *Bacillus thuringiensis* toxins and a hybrid *B. thuringiensis* strain counter greenhouse-selected resistance in *Trichoplusia ni*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5739-5741.

## G

Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. **Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*.** *Science.* 293, 857–860

Gahan, L.J., Pauchet, Y., Vogel, H., Heckel, D.G. **An ABC Transporter Mutation Is Correlated with Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin.** *PLoS Genet* 6(12): e1001248. doi:10.1371/journal.pgen.1001248

Gamma Z, Nakagoshi N. 2014. **Safe Strategy to Control Mosquito: The Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolated Indigenously from East Java as a Natural Agents of Mosquito: *Aedes aegypti*.** *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3(2): 179-197.

Garczynski, S.F., Adang, M.J., 1995. ***Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor.** *Insec. Biochem. Mol. Biol.* 25, 409-415.

Ge, A.Z., Shivarona, N.I., Dean, D.H., 1989. **Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 79, 6951-6955.

Georghiou, G.P., Wirth, M.C., 1997. **Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).** *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1095-1101.

Gómez, I., Miranda-Ríos, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D.I., Gill, S.S. *et al.*, 2002a. **Hydrophobic complementary determines interaction of epitope <sup>869</sup>HITDTNNK<sup>876</sup> in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins.** *J. Biol. Chem.* 277, 30137-30143.

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

Gómez, I., Dean, D., Bravo, A., Soberón, M., 2003. **Molecular Basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Specificity: Two Structural Determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 Receptor Interact with Loops a8 and 2 in Domain II of Cy1Ab Toxin.** *Biochem.* 42: 10482-10489.

Gonzalez, D., 2009. **Análisis de la eliminación de fragmentos en el extremo N-terminal de la toxina Cry1Ac y su efecto en la toxicidad contra *Manduca sexta*.** Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Gould, F., 1998. **Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pests genetics and ecology.** *Annu. Rev. Entomol.* 43, 701–726.

Griffitts, J.S., Whitacre, J.L., Stevens, D.E., Aroian, R.V., 2001. ***Bacillus thuringiensis* toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme.** *Science.* 293, 860–864.

Griffitts, J.S., Aroian, R.V., 2005. **Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins.** *Bioessays.* 27, 614–624.

Guerchicoff, A., Delécluse, A., Rubinstein, C.P., 2001. **The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxin constitute a gene family.** *App. Environ. Microbiol.* 67, 1090-1096.

Gunning, R.V. Dang, H.T., Kemp, F.C., Nicholson, C.I., Moores, G.D., 2005. **New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crop expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin.** *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2558–2563.

Guttmann, D.M., Ellar, D.J., 2000. **Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors.** *FEMS Microbiol. Lett.* 188, 7-13.

## H

Haider, M.Z., Ellar, D.J., 1989. **Functional mapping of an entomocidal  $\delta$ -endotoxin: single amino acid changes produce by site directed mutagénesis influence toxicity and specificity of the protein.** *J.Mol. Biol.* 208, 183-194.

Haider, M.Z., Smith, G.P., Ellar, D.J., 1989. **Delineation of the toxin coding fragments and an insect-specificity región of a dual toxicity *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene.** *FEMS. Microbiol. Lett.* 49, 157-163.

Helgason, E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., *et al.*, 2000. ***Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, y *Bacillus thuringiensis*: one species on the basis of genetic evidence.** *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2627-2630.

Herrero, S., Oppert, B., Ferré, J. 2001. **Different Mechanisms of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Indianmeal Moth.** *Appl Environ Microbiol.* 2001 March; 67(3): 1085–1089.

Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. **Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis***. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.

## J

Janmaat, A.F., Myers, J.H., 2003. **Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Tricoplusia ni***. *Proc. Biol. Sci.* 270, 2263–2270.

Jenkins, J.L., Dean, D.H., 2000. **Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods**. En: Setlow, K. (Ed.), *Genetic Engineering: Principles and Methods*, vol. 22. Plenum, Nueva York. 33-54pp.

Jiménez J, Muñoz G, C., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Alamazo, J. *et al.* 2007. ***Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae**. *J. Biol. Chem.* 282, 21222-21229.

Jurat-Fuentes, J.L., Gould, F.L., Adang, M.J., 2002. **Altered glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlated with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins**. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5711-5717.

Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J. 2004. **Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae**. *Euro. J. of Biochem.* 271: 3127–3135

Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J. 2006. **Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae**. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 166–171.

## K

Kleter, G.A., Bhula, R., Bodnaruk, K., Carazo, E., Felsot, A.S, *et al.* 2007. **Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective**. *Pest Manag. Sci.* 63, 1107–1115.

Knight, P., Crickmore, N., Ellar, D.J., 1994. **The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(C) delta-endotoxin in brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N**. *Mol. Microbiol.* 11, 429-436.

Kouskoura, T., Tickner, C., Crickmore, N., 2001. **Expression and cristalization of an N-terminally activated form of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin.** *Curr. Microbiol.* 43, 371-373.

## L

Lambert, B., Buysse, L., Decock, C., Jansens, S., Piens, C., 1996. **A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae.** *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 80-86.

Lereclus, D. Agaisse, H., Gominet, S., Salamitou, S., Sanchis, V., 1996. **Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase.** *J.Bacteriol.* 178, 2749-2756.

Lereclus, D. Agaisse, H., Grandvaletl, C., Salamitou, S., Gominet, M. 2000. **Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*.** *Int. J. Med. Microbial.* 290, 295-299.

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

Li, J., Pandelakis, A.K., Ellar, D., 1996. **Structure of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* ssp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation.** *J. Mol. Biol.* 257, 129-152.

Lorence, A., Darszon, A., Díaz, C. Liévano, A., Quintero, R., *et al.*, 1995.  **$\delta$ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers.** *FEBS Lett.* 360, 217-222.

Loseva, O.I., Toktopulo, E.I., Vasilev, V.D., Nikulin. A.D., Dobritsa, A.P., *et al.*, 2001. **Structure of Cry3A  $\delta$ -endotoxin with phopholipid membranes.** *Biochemistry.* 40, 14143-14151.

## M

Malvar, T. y Baum, J.A. 1994. **Tn5401 disruption of the spoOF gene, identified by direct chromosomal sequencing, results in CryIIIa overproduction in *Bacillus thuringiensis*.** *J Bacteriol.* 176, 4750-4753.

Martens, J.W.M., Visser, B., Vlak, J.M., Boch, D., 1995. **Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) protoxin.** *Mol. Gen. Genet.* 247, 482-487.

Mesrati, L.A., Tounsi, S. and Jaoua, S. 2005. **Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid.** *FEMS Microbiol Lett.* 244, 353–358

Miranda, R., Zamudio, F., Bravo, A., 2001. **Processing of Cry1Ab  $\delta$ -Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by midgut proteases: role in toxin activation and inactivation.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1155-1163.

Moran, C.P. 1993. **RNA polymerase and transcription factors.** In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, eds., *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria Washington, DC: *American Society for Microbiology.* 653-67.

Morin, S., Biggs, R.W., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., *et al.*, 2003. **Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 100, 5004-5009.

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

Muñoz, C., Portugal, L., Pardo-López, L., Jiménez-Juárez, N., Arenas, I. *et al.*, 2009. **Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects.** *Biochim Biophys Acta.* 1788, 2229-37.

## N

Nester, E. W., L. S. Thomashow, M. Metz, and M. Gordon. 2002. **100 Years of *Bacillus thuringiensis*: A Critical Scientific Assessment.** *American Academy of Microbiology.*

## O

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

Ounjai P. 2007. **Molecular biophysical study of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin pore structure.** Tesis de Doctorado. Bangkok: Mahidol University, Institute of Molecular Biosciences.

Ounjai, P, Unger, V.M, Sigworth, F.J, Angsuthanasombat, C. 2007. **Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: implications for toxin-pore formation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 361:890-895.

## P

Pang, A.S., Gringorten, J.L., Bai, C., 1999. **Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes.** *Can. J. Microbiol.* 45, 816-825.

Pardo-López, L. Gómez, I., Rausell, C., Sánchez, J., Soberón, M., *et al.*, 2006. **Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion.** *Biochemistry.* 45, 10329–10336.

Park, H.W., Bideshi, D. y Federici, B.A. 2000. **Molecular Genetic Manipulation of Truncated Cry1C Protein Synthesis in *Bacillus thuringiensis* To Improve Stability and Yield.** *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (10): 4449-4455.

Peng, D., Ruan, L., Yu, Z, Sun, M. 2010. **Enhancing Cry1Ac toxicity by expresion of the *Helicoverpa armigera* cadherin fragment in *Bacillus thuringiensis*.** *Res. Microbiol.* 161 (5): 383-389.

Peyronnet, O., Nieman, B., Génereux, F., Vachon, V., Laprade, R., 2002. **Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin in planar lipid bilayers.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1567, 113-122.

Piggot, C.R., y Ellar, D.J. 2007. **Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity.** *Microbiol. & Mol. Biol. Rev.* 71 (2): 255-281.

## Q

Qaim, M., Zilberman, D. 2003. **Yield effects of genetically modified crops in developing countries.** *Science.* 299, 900–902

## R

Rahman, M.M., *et al.*, 2004. **Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2696–2699.

Roh JY, Chai JY, Li MS, Jin BR, Je YH. 2007. ***Bacillus thuringiensis* as a specific safe, and effective tool for insect pest control.** *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 547-559.

## S

Pacheco S, Gómez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodriguez-Almazan C, Gill SS, Bravo A & Soberón M. 2009. **Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping-pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopetidase-N and cadherin receptors.** *J Biol Chem.* 284: 32750–32757.

Sanchis V., Agaisse H., Chaufaux J., Lereclus D. 1996. **Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expresión system of cryIII<sub>A</sub> and a site specific recombinant vector.** *J. Biotech.* 48, 81-96.

Sasaki J, Asano S, Hashimoto N, W. Lay B, Hastowo S, Bando H, Iizuka T. 1997. **Characterization of a cry2A Gene Cloned from an Isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar sotto.** *Current Microbiol.* 35 (1): 1-8.

Sayyed, A.H., Crickmore, N., Wright, D.J., 2001. **Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain.** *Appl. Environ. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 705-806.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J.R., *et al.*, 1998. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 62, 705-806.

Schwartz, J.L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., *et al.*, 1997. **Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxins molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering.** *FEBS. Lett.* 410, 397-402.

Selvapandiyan, A., Arora, N., Rajagopal, R., Jalali, S.K., Venkatesan, T., Singh, S.P. and Bhatnagar, R.K. 2001. **Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative**

**insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 67, 5855–5858.**

Shao, Z., Cui, Y., Liu, X., Yi, H., Ji, J. *et al.*, 1998. **Processing of  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 73-81.**

Soberón, M., Bravo, A. 2007. **Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: Modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología.* 14, 303-313.**

Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B.E., *et al.*, 2007. **Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science.* 318, 1640–1642.**

Soberón, M., Gill, S., Bravo, A., 2009. **Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells. *Cell.Mol.Life Sci.* 66: 1337 – 1349.**

Soberón M, Pardo L, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Gómez I, Porta H, Bravo A. 2010. **Pore formation by Cry toxins. *Adv Exp Med Biol.* 677:127-42.**

## T

Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N. & Johnson, M. W. 1990. **Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83, 1671-1676.**

Tabashnik, B.E., 1994. **Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 47–79.**

Tabashnik, B. E., Johnson, K. W., Engleman, J. T. & Baum, J. A. 2000. **Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ja in a strain of diamondback moth adapted to artificial diet. *J. Invert. Pathol.* 76, 81-83.**

Tabashnik, B.E., Carrière, Y., Dennehy, T.J., Morin, S., Sisterson, M.S., *et al.*, 2003. **Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* 96, 1031–1038.**

Tabashnik, B.E., Gassmann, A., Crowder, D., Carrière, Y., 2008. **Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.* 26, 199–202.**

Tabashnik, B. E., Huang, F., Ghimire, M. N., Rogers, L. B., Siegfried, B.D., *et al.*, 2011. **Efficacy of Genetically Modified Bt Toxins Against Insects with Different Mechanisms of Resistance.** 29: 1128-1131.

Tanaka, S., Miyamoto, K., Noda, H., Jurat-Fuentes, J. L., Yoshizawa, Y., Endo, H. and Sato, R. 2013. **The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*.** *FEBS Journal*, 280: 1782–1794. doi: 10.1111/febs.12200

Taveecharoenkool, T, Angsuthanasombat, C, Kanchanawarin, C. 2010. **Combined molecular dynamics and continuum solvent studies of the pre-pore Cry4Aa trimer suggest its stability in solution and how it may form pore.** *PMC Biophysics*. 3: 10

Terra, W., Ferreira, C., 1994. **Insect digestive enzymes: properties, compartamentalization and function.** *Comp. Biochem. Physiol. B*. 109, 1-62.

Tran, L.B., Vachon, V., Schwartz, J.L., Laprade, R., 2001. **Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins.** *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4488-4494.

## V

Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., Bulla, L.A., Jr., 1995. **Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*.** *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494.

Von-Tersch, M.A., Slatin., S.L., Kulesza, C.A., English, L.H., 1994. **Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide.** *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3711-3717.

## W

Wang, P. 2010. **Paper presented at the Annual Meeting of the Entomological Society of America.** San Diego, California.

Warren, G., 1997. **Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pest.** En: Carozzi, N., Koziel, M. (Eds.), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants.* Taylor y Francis, London, 109-121.

Wirth, M.C., Delécuse, A., Walton, W.E., 2001. **CytAb1 and Cyt2Ba1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin and *B. thuringiensis* subsp. israelensis synergize *Bacillus***

*sphaericus* against *Aedes aegypti* and resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3280-3284.

Wirth, M.C., Park, H.W., Walton, W.E., Federici, B.A., 2005. **Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 185–189.

Wong, H.C., Schnepf, H.E., Whiteley, H.R. 1983. **Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene.** *J Biol Chem.* 258:1960-7.

Wu, D., Aronson, A.I., 1992. **Localized mutagenesis define regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity.** *J. Biol. Chem.* 267, 2311-2317.

Wu, D., Johnson, J.J., Federici, B.A., 1994. **Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA y CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*.** *Mol. Microbiol.* 13, 965-972.

## X

Xu, X., Yu, L., Wu, Y., 2005. **Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 948–954.

## Y

Yamagiwa, M., Esaki, M., Otake, K., Inagaki, M., Komano, T., *et al.*, 1999. **Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3464-3469.

Yang, Y. Chen, H., Wu, Y., Yang, Y., Wu, S., 2007. **Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac.** *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6939–6944.

Yu, C., Mullins, M., Warren, G., Koziel, M. y Estruch, J. 1997. **The *Bacillus thuringiensis* vegetative Insecticidal Protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects.** *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 532-536.

## Z

Zalunin, I.A., Revina, L.P., Kostina, L.I., Chestukhina, G.G., Stepanov, V.M., 1998. **Limited proteolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIG y CruIVB  $\delta$ -endotoxins leads to formation of active fragments that do not coincide with the structural domains.** *J. Protein Chem.* 17, 463-471.

Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Lee A. Bulla, L.A. Jr. 2006. **A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9897–9902.

Zhang, X., Tiewisiri, K., Kain, W., Huang, L., Wang, P. 2012. **Resistance of *Trichoplusia ni* to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac Is Independent of Alteration of the Cadherin-Like Receptor for Cry Toxins.** *PLoS ONE.* 7(5): e35991. doi:10.1371/journal.pone.0035991

Zhao, J.Z., Cao, J., Collins, H.L., Bates, S.L., Roush, R.T., *et al.*, 2005. **Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8426–8430.

Zheng A, Zhu J, Tan F, Guan P, Yu X, Wang S, Deng Q, Li S, Liu H, Li P. 2010. **Characterisation and expression of a novel haplotype cry2A-type gene from *Bacillus thuringiensis* strain JF19-2.** *Annals of Microbiol.* 60 (1): 129-134.

Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez, I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., *et al.*, 2002. ***Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation.** *J. Biol. Chem.* 277, 13863-13872.