



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS δ -ENDOTOXINAS DE
Bacillus thuringiensis PARA EL CONTROL DE LA
“CONCHUELA DEL FRIJOL” *Epilachna varivestis*
MULSANT (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. GUADALUPE PEÑA CHORA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS δ -ENDOTOXINAS DE
Bacillus thuringiensis PARA EL CONTROL DE LA
“CONCHUELA DEL FRIJOL” *Epilachna varivestis*
MULSANT (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. GUADALUPE PEÑA CHORA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2010

AGRADECIMIENTOS

A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR PERMITIRME
REALIZAR LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO

A UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS POR
PERMITIR QUE REALIZARA EL DOCTORADO Y AL PROGRAMA
DEL MEJORAMIENTO DEL PROFESORADO (PROMEP), DE LA
SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA, POR EL APOYO
ECONÓMICO BRIDADO DURANTE MIS ESTUDIOS DE
DOCTORADO

Agradezco profundamente a la Dra. Alejandra Bravo de la Parra su apoyo para la realización del presente trabajo.

Al los Doctores Edgardo Escamilla Marvan y Roberto Coria Ortega, miembros de mi comité tutorial por las sugerencias hechas durante el desarrollo de esta investigación, las cuales enriquecieron los resultados obtenidos.

Al Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Juan Miranda Ríos, Dr. Raúl Miranda Casaluengo, Dra. Isabel Gómez Gómez, Dra. Liliana Pardo López, Dra. Claudia Pérez Ortega, Dr. Gustavo de la Riva, M. en B. María Luisa Tabche Barrera, M. en C. Leopoldo Guereca por sus comentarios y compartir conmigo sus conocimientos.

Al Biol. Jorge F. Sánchez Quintanilla, Sr. Oswaldo López Gutiérrez, M. en C. Laura Lina García, Biol. Ismael Anaya Calvo, Ing. Andrés Alvear García, Sergio Blancas Naranjo, Germán Alejandro Uribe Soriano y a Graciela Domínguez Pineda por su apoyo durante la realización del presente trabajo.

Al los miembros del Jurado revisor de tesis Dra. Helena Porta Ducoing, Dra. Isabel Gómez Gómez, Dra. Liliana Pardo López, Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Edgardo Escamilla Marvan y Dr. Roberto Coria Ortega por sus valiosas sugerencias.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ALEJANDRA
BRAVO DE LA PARRA

LA INVESTIGACIÓN FUE FINANCIADA POR LA EUROPEAN
COMMISSION INCO. INCO. ERB3514PL972673. 1998. TITULO DEL
PROYECTO: DEVELOPMENT OF NEW BIOPESTICIDES FOR
ENVIRONMENTALLY-FRIENDLY CONTROL.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre Angela Chora López y a mi padre Emilio Peña Ramost.

A mis hermanos Sabino, María, Avelina, Rafael y Anselma

A mis sobrinos Rudy, Mayra, Araceli, Daniel, Vilmer Emilio, Angela Zithlally, Rodrigo, Victoria Paloma y Pamela.

A mis hijos Cinthya Shugey, José Antonio y Pablo Emilio

A mis nietos Carlos Andrés y Alondra Naomi

A mi esposa María Guadalupe por su apoyo durante todo el tiempo que llevamos juntos.

ÍNDICE

	No. de página
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCION.....	1
El problema de las plagas.....	1
Las plagas de insectos y los problemas causados por los insecticidas químicos.....	2
1. ANTECEDENTES.....	4
1.1. Control microbiano de insectos.....	4
1.1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
1.1.1.1. Plantas transgénicas.....	10
1.1.1.2. Resistencia de insectos plaga a δ -endotoxinas de <i>B. thuringiensis</i>	15
Cambios en el procesamiento proteolítico.....	15
Modificación de los sitios de unión.....	16
1.1.1.3. Protoxinas de <i>B. thuringiensis</i>	16
Las δ -endotoxinas.....	16
Nomenclatura de las δ -endotoxinas.....	17
1.1.1.4. Modo de acción de las toxinas Cry1.....	18
1.1.1.5. Estructura iridimensional.....	20
1.1.1.6. Las toxinas citolíticas de <i>B. thuringiensis</i>	22
1.1.1.7. Proteínas Insecticidas Vegetativas.....	22
1.1.1.8. Proteínas binarias.....	23
1.1.1.9. Proteínas relacionadas a Mtx2/3.....	23
1.1.1.10. Proteínas de superficie (S-layer).....	24
1.1. 2. Importancia de la búsqueda de nuevas toxinas.....	26
1.2. <i>Epilachna varivestis</i> Muls. (Coleoptera: Coccinellidae) una plaga de frijol importante.....	27
1.3. Uso de <i>B. thuringiensis</i> en el control de <i>E. varivestis</i>	29
2. HIPOTESIS.....	31

3. OBJETIVOS.....	31
4. METAS.....	31
5. MATERIALES Y METODOS.....	32
5.1. Cría de <i>E. varivestis</i>	32
5.2. Origen de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> evaluadas.....	33
5.2.1. Producción de esporas-cristales de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> evaluadas.....	33
5.2.2. Bioensayos preliminares y su estandarización con larvas neonatas de <i>E. varivestis</i>	34
5.3. Aislamiento de cepas de <i>B. thuringiensis</i> a partir de cadáveres de larvas de <i>E. varivestis</i>	34
5.4. Postulados de Koch.....	35
5.5. Bioensayos para determinar la CL ₅₀ de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> aisladas <i>E. varivestis</i> usando esporas-cristal y de la cepa seleccionada con cristal puro	36
5.6. Bioensayos contra <i>Manduca sexta</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Aedes aegypti</i>	36
5.7. Corroboración de la especie <i>B. thuringiensis</i>	38
5.8. Caracterización de la cepa GP1.....	38
5.9. Purificación de la proteína solubilizada por medio de cromatografía de intercambio iónico.....	38
5.10. Bioensayos con la proteína solubilizada y purificada por intercambio iónico.....	39
5.11. Producción de anticuerpos.....	40
5.12. Western blot.....	40
5.13. Secuencia del N-terminal.....	41
5.13.1. Secuencia del N-terminal de un fragmento interno.....	42
5.14. Diseño de oligonucleótidos para obtener la secuencia completa del gene.	42
5.15. Diseño de oligonucleótidos para clonar el gene.....	43

5.16. Estrategia utilizada para clonar el gene S-layer.....	44
5.17. Interrupción del gene S-layer en la cepa GP1.....	45
5.18. Expresión de la proteína S-layer.....	46
5.19. Detección de proteína S-layer en otras cepas de <i>B. thuringiensis</i>	47
5.20. Extracción química de la proteína S-layer de la cepa nativa y de la recombinante.....	47
5.21. Purificación de la proteína GP1.....	48
5.22. Análisis filogenético de la proteína GP1 S-layer y otras proteínas S-layer.....	48
6. RESULTADOS.....	50
6.1. Cría de <i>E. varivestis</i>	50
6.2. Producción de esporas-cristales de las cepas evaluadas de <i>B. thuringiensis</i>	50
6.3. Bioensayos preliminares y su estandarización con larvas neonatas de <i>E. varivestis</i>	50
6.4. Bioensayos preliminares de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> de las diferentes colecciones.....	51
6.5. Aislamiento de cepas de <i>B. thuringiensis</i> a partir de cadáveres de larvas de <i>E. varivestis</i>	52
6.6. Postulados de Koch.....	53
6.7. Bioensayos para calcular la CL ₅₀ de las cepas más tóxicas a larvas neonatas de <i>E. varivestis</i> usando esporas-cristal y de la cepa seleccionada con cristal puro	54
6.8. Bioensayos contra <i>M. sexta</i> , <i>S. frugiperda</i> y <i>A. aegypti</i>	56
6.9. Corroboración de la especie <i>B. thuringiensis</i>	56
6.10. Caracterización de la cepa GP1	57
6.11. Purificación de la proteína por intercambio iónico.....	57
6.12. Bioensayos con la proteína solubilizada y purificada por intercambio iónico.....	58
6.13. Secuencia del N-terminal.....	58

6.14. Secuencia del N-terminal de un fragmento interno.....	58
6.15. Diseño de oligonucleotidos y estrategia para obtener la secuencia completa del gene.....	60
6.16. Detección de proteína S-layer en otras cepas de <i>B. thuringiensis</i>	62
6.17. Mutagenesis por interrupción del gene S-layer con casete de resistencia a Kanamicina.....	63
6.18. Diseño de oligonucleótidos para clonar el gene.....	64
6.19. Bioensayos con la proteína recombinante.....	65
6.20. Expresión de la proteína S-layer.....	66
6.21. Purificación química de la proteína S-layer de las cepas nativa y recombinante.....	68
6.22. Relación filogenética de la proteína de superficie GP1 y otras proteínas de superficie.....	69
7. DISCUSIÓN.....	74
8. CONCLUSIONES.....	78
9. PERSPECTIVAS.....	79
APÉNDICE.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	106

INDICE DE FIGURAS

No. página

Figura 1. Diversas formas y tamaños de cristales producidos por <i>B. thuringiensis</i> : C, cristal. Tomado de Bravo <i>et al.</i> , 1998.....	8
Figura 2. Proteínas Cry de tres dominios (Crickmore <i>et al.</i> , 2010. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil Crickmore/Bt/index.html).....	11
Figura 3. Modo de acción de las toxinas Cr1. 1) El insecto ingiere las esporas y cristales; 2) Los cristales son solubilizados; 3) Activación proteolítica de la toxina, el monómero se une a los receptores anclados por GPI Aminopeptidasa o Fosfatasa alcalina; 4) La toxina se une al receptor Caderina y sufre un corte proteolítico de la α hélice 1; 5) Lo que permite la formación del oligómero que sufre cambios conformacionales; 6) El oligómero se une con una alta afinidad a los receptores Aminopeptidasa o Fosfatasa Alcalina anclados a GPI; 7) la toxina se inserta, se forma el poro; 8) Ocorre un desbalance osmótico; 9) La célula muere y se rompe, las esporas entran en contacto con la hemolinfa, germinan y el insecto muere (Pacheco <i>et al.</i> , 2009).....	19
Figura 4. Estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa (Grochulski <i>et al.</i> , 1995).....	21
Figura 5. Otras proteínas insecticidas producidas por <i>B. thuringiensis</i> (Tomado de Crickmore <i>et al.</i> , 2010. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil Crickmore/Bt/index.html).....	25
Figura 6. Ciclo biológico de <i>Epilachna varivestis</i> . A adultos; B huevos; C larva y D pupas.....	28
Figura 7. Patrón de proteínas producidos por las cepas aisladas de cadáveres de larvas de <i>Epilachna varivestis</i> colectados en campo.....	53
Figura 8. Espora y cristal proteico producido por la cepa GP1, observación en microscopio óptico con objetivo 100X y prisma de Normarski.....	54
Figura 9. Proteína purificada por intercambio iónico. Carril 1 marcador de peso molecular; Carriles 7, 8 y 9 proteína de 100kDa con actividad a <i>E. varivestis</i> ...57	
Figura. 10. Estrategia empleada para obtener la secuencia completa del gene que codifica la proteína GP1	62
Figura 11. Análisis de la presencia de la proteína S-layer en diferentes subespecies de <i>B. thuringiensis</i> y otras cepas de <i>Bt</i> por medio de la técnica de western blot.....	63

Figura 12. Estrategia utilizada para clonar el gene S-layer de la cepa GP1 en una cepa acristalifera de *B. thuringiensis*.....66

Figura 13. Western blot con el anticuerpo policlonal anti-GP1; 1. Marcador de Peso Molecular; 2. Proteínas totales *Bt* 407:pHT315; 3. *B t* 407:pHTGP1; 4. *Bt* 407:pHTGP1 48h; 5. Esporas–cristales GP167

Figura 14. Expresión de la proteína S-layer durante diferentes fases de desarrollo.....68

Figura 15. Extracción química de la proteína S-layer. Panel A: M Marcador de peso molecular; carriles 1, 3, 5, visualización de la proteína S-layer en las células de las diferentes cepas después de la extracción química; carriles 2, 4 y 6 proteína S-layer extraída químicamente. Panel B detección de la proteína por Western blot en las diferentes cepas, sobre las células y proteína extraída químicamente.....69

Figura 16. Agrupación de las diferentes proteínas S-layer producidas por las diferentes especies de bacterias.....72

INDICE DE TABLAS

	No. de página
Tabla 1. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> de las colecciones de <i>Bt</i> que mostraron actividad contra larvas de <i>Epilachna varivestis</i>	52
Tabla 2. CL ₅₀ de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> aisladas de cadáveres de larvas de <i>Epilachna varivestis</i> colectadas en campo.....	55
Tabla 3. Concentración Letal ₅₀ empleando cristales puros de la cepa GP1 con larvas neonatas de <i>Epilachna varivestis</i>	55
Tabla 4. Por ciento de mortalidad causada por espora-cristal de la cepa GP1 sobre larvas neonatas de <i>M. sexta</i> , <i>S. frugiperda</i> y <i>Ae. Aegypti</i>	56
Tabla 5. Por ciento de mortalidad causada por la proteína producida por la cepa GP1 de <i>B. thuringiensis</i> solubilizada y purificada por intercambio iónico a larvas neonatas de <i>E. varivestis</i>	58
Tabla 6. Localización de las secuencias de fragmentos de GP1 en proteínas homólogas OIpA de <i>Bacillus lechiniformis</i> (u38842) y de <i>Bacillus anthracis</i> EA1(x99724).....	59
Tabla 7. Por ciento de identidad de la secuencia de 1495 pb del gene S-layer de la cepa GP1 y otros genes S-layer de otras especies de <i>Bacillus</i>	60
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para obtener la secuencia completa del gene S-layer de la cepa GP1 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	61
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para clonar el gene S-layer de la cepa GP1 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	64
Tabla 10. Proteínas de superficie utilizadas en el análisis filogenético.....	70
Tabla 11. Porcentaje de identidad en la secuencia primaria entre las proteínas S-layer.....	72

RESUMEN

Epilachna varivestis, es un insecto fitófago del orden Coleoptera, plaga de frijol que se controla con varias aplicaciones de insecticidas químicos, lo que elimina la entomofauna benéfica. *Epilachna varivestis* ha desarrollado resistencia hacia algunos productos químicos. Una alternativa para su control pueden ser las proteínas producidas por *Bacillus thuringiensis* (Bt). Por lo que en este trabajo se evaluaron cepas de Bt de dos colecciones y además se aislaron cepas de Bt de cadáveres de *E. varivestis*. Se probaron 241 cepas nativas de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *E. varivestis* a dosis de 100 y 1000 ng/cm², además de cepas de Bt control; 10 tipos diferentes de toxinas Cry1 contra lepidópteros, 5 tipos diferentes de toxinas Cry3 y Cry7 contra coleópteros y 4 tipos diferentes de toxinas Cry4 contra dípteros. Ocho cepas produjeron mortalidades menores al 50% a dosis de 100ng/cm² y solo una causó 80% de mortalidad a 1000ng/cm² de follaje. Se buscó una cepa más virulenta, se aislaron cuatro cepas directamente de un cadáver de larvas de *E. varivestis*, todas producen una proteína de 100 kDa. Una cepa fue seleccionada se le nombró GP1. Se calculó la Concentración Letal cincuenta (CL₅₀) con esporas-cristales y cristales puros (14.1 y 8.6ng/cm², respectivamente), también se evaluó contra *Spodoptera frugiperda*, *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*, sin causar ninguna mortalidad a éstas especies. La cepa GP1 se caracterizó por PCR con oligonucleótidos generales, todas las reacciones de PCR fueron negativas, por lo que se asumió que se trataba de un gene nuevo.

La proteína fue purificada, se secuenció el N-terminal (AGKSFPDVPAGH), también de un fragmento interno de 50 kDa (KLPVTFVTTDQYGDYGAN), el análisis de Blast resultó en que ambas secuencias concuerdan con las proteínas de superficie de *B. lechiformis* OlpA y de *B. anthracis* EA1. Se diseñó un total de tres pares de oligonucleótidos para obtener la secuencia completa del gene *gp1*.

El gene completo *sl-gp1* se clonó en el vector pHT315 y se transformó en la cepa acristalífera 407 de Bt, amplificando tres productos por PCR (BSLX-1 y BSLN-5; BSLN-6 y BSLP-8; BSLP-7 y EAGB-4) que sobrelapan en los sitios

de restricción *NcoI* y *PstI*, respectivamente. Se evaluó la toxicidad de un cultivo esporulado de una clona y produjo un 100% de mortalidad de larvas del primer estadio de *E. varivestis* a una concentración de 1000 ng/cm². La CL₅₀ se determinó utilizando cristales puros y fue de 12.65 ng/cm².

La proteína SL-GP1 se expresa durante la fase vegetativa y también durante la esporulación. Durante la fase vegetativa la proteína está asociada a la bacteria ya que toda la proteína detectada por Western blot se encontró en la pastilla que se obtuvo después de la centrifugación del cultivo. Durante la fase de esporulación la proteína se observa asociada a la bacteria y también se encontró en el sobrenadante del cultivo centrifugado.

El alineamiento de aminoácidos de 32 diferentes proteínas de superficie se utilizó para analizar la relación filogenética de estas proteínas. Este análisis muestra que las proteínas de superficie es una familia compuesta de grupos de proteínas altamente variables entre los diferentes grupos independientes. Las proteínas de superficie de *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. anthracis*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis* están agrupadas en una misma rama principal (Grupo 1). Las proteínas de superficie de otras bacterias están agrupadas juntas en ramas separadas indicando la relación entre los miembros de cada rama durante su evolución. La proteína de superficie GP1 está altamente relacionada a la proteína EA1 de *B. anthracis* y a la proteína CTC reportada de *B. thuringiensis* con un 92% de identidad en la secuencia primaria. La proteína de superficie GP1 tiene un 63% de identidad con la proteína OlpA de *B. licheniformis* (U38842). Con relación al resto de las proteínas de superficie encontradas en el grupo *Bacillus*, su relación es bastante baja ya que varía de un 27 a solo 2% de identidad

Se encontró por primera vez que una proteína S-Layer de *B. thuringiensis* es tóxica para un insecto plaga, lo cual amplía los grupos de proteínas producidas por Bt con propiedades insecticidas.

ABSTRACT

“The mexican bean beetle” *Epilachna varivestis* is a key pest of beans in México, its control is with several applications of chemical insecticides, but these also kill beneficial insects and this pest has developed resistance to some insecticides. An alternative to control this pest could be the use of proteins produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt). In this work, we evaluated 241 native Bt strains belonging to two collections against neonate larvae of *E. varivestis*, two dosis were evaluated, 100 y 100ng/cm², also 10 different Cry1 toxins, five different toxins Cry3 and Cry 7 active against Coleoptera and four Cry4 toxins active against Diptera. Eight strains caused mortalities below 50% with 100 ng/cm² and only one above 80% with 1000 ng/cm². We look by more virulent strains, this was achieve isolating them from a *E. varivestis* larvae cadaver collected at bean fields. Four strains were isolated, all produced a 100kDa protein, one was selected and named GP1. The lethal concentration 50 LC₅₀ was calculated with spores-crystals and pure crystals (14.1 and 8.6 ng/cm², respectively). This strain also was evaluated against *Spodoptera frugiperda*, *Manduca sexta* and *Aedes aegypti*, but it was not toxic to these insects. The GP1 strain was characterized with general oligonucleotides, all the reactions were negative and we assumed that is was a new gene.

The protein was purified, and the N-terminal sequence was performed (AGKSFPDVPAGH), an 50 kDa internal fragment was also sequenced (KLPVTFVTTDQYGDYGAN), Blast analysis showed that both sequences are similar to S-layer proteins of *B. lechiformis* OlpA and de *B. anthracis* EA1. Three pairs of oligonucleotides were designed to obtain the complete sequence of the gene *gp1*.

The complete *sl-gp1* gene was cloned in pHT315 vector and transformed in acrycristiferous Bt 407 strain, amplifying three PCR products (BSLX-1 and BSLN-5; BSLN-6 and BSLP-8; BSLP-7 and EAGB-4), that overlap at restriction sites *NcoI* and *PstI*, respectively. A clone produced 100% mortality to neonate larvae of *E. varivestis* at 1000 ng/cm². The lethal concentration 50 was performed with pure crystals and was 12.65 ng/cm².

The SL-GP1 protein is expressed during the vegetative stage and also on sporulation stage. During the vegetative stage the protein is associated with the bacteria because all protein was detected by western blot on the pellet that was obtain after centrifugation. On the sporulation stage the protein is associated with the bacteria and also on the supernatant.

The alignment of amino acids of 32 different proteins was used to phylogenetic analysis. This analysis shows that the s-layer proteins are family composed of groups of proteins highly different. The s-layer proteins of *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. anthracis*, *B. licheniformis* and *B. thuringiensis* are grouped in the same branch (group 1). The s-layer proteins of other bacteria are group together on separated branches showing evolutionary relationship among the members. The s-layer protein GP1 is highly related to EA1 protein of *B. anthracis* and to the CTC protein of *B. thuringiensis* with 92% of identity of the primary sequence, and 63% of identity with the OlpA protein of *B. lecheniformis*. In relationship with others s-layer proteins of the *Bacillus* group is quite low, 27 to 2% of identity.

This is the first report that shows that an s-layer protein of *B. thuringiensis* is toxic to an insect pest, increasing the groups of proteins produced by Bt with insecticidal properties.

INTRODUCCIÓN

El problema de las plagas

El crecimiento de la población mundial ha transformado una proporción grande de la superficie terrestre provocando disturbios ambientales, ya que el hombre al concentrarse en grandes ciudades altera los ecosistemas para cubrir sus necesidades de habitación, vestido y alimentación, desforestando selvas tropicales, practicando la agricultura de subsistencia e intensiva o expandiendo las áreas urbanas (Caldas de Castro *et al.*, 2006; Foley *et al.*, 2005; Otsuka, 2003; Parris y Kates, 2003; Thomson, 2003; Vitousek *et al.*, 1997; Western 2001). Para la producción de alimentos se han modificado grandes extensiones de tierra, dónde se cultivan pocas especies de plantas en grandes superficies generando el desarrollo de plagas (insectos, bacterias, nemátodos, hongos, virus y malezas) (Foley *et al.*, 2005; Godfray *et al.*, 2010; Heller y Keoleian, 2003; Matson *et al.*, 1997; Tilman, 1999). Las plagas pueden causar destrucciones masivas de cultivos importantes y estas pérdidas causa grandes efectos socioeconómicos (National Academy of Sciences, 2000).

Las plagas se alimentan de las plantas cultivadas o compiten por nutrientes, agua y luz, por lo que se requiere eliminarlos, se han utilizado pesticidas para proteger los cultivos, de lo contrario podrían causar la pérdida total de la producción o causar enfermedades ya que son vectores de microorganismos patógenos a humanos y de sus animales domésticos (Caldas de Castro *et al.*, 2006; Gratz, 1999; Margni *et al.*, 2002; Thomas, 1999; Zaim y Guillet, 2002). Dependiendo solamente del uso intensivo de agroquímicos para el control de estas plagas (Lewis *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1990; Thomas, 1999). Estudios reportan que, aún con el uso de plaguicidas se tienen pérdidas de cultivos (Palumbi, 2001) y desarrollo de resistencia por parte de las plagas (National Academy of Sciences, 2000; Whalon *et al.*, 2007). Aunado a lo anterior existe una demanda por parte de los consumidores de productos cada vez de mayor calidad (Broadhurst, 1998; Frank *et al.*, 2004; Rossing y Heong 1997).

Las plagas de insectos y los problemas causados por los insecticidas químicos

Los insectos si no se controlan pueden causar la pérdida total, tanto del cultivo como de la cosecha en almacén, o causar enfermedades. Para reducir los efectos negativos de los insectos plaga se emplean insecticidas químicos sintéticos a gran escala en la agricultura desde 1939, reduciendo las pérdidas. Sin embargo estos beneficios implican costos ambientales y sociales como son: la contaminación de suelos, agua, presencia de residuos en productos vegetales para consumo animal y humano, efectos adversos a organismos no blancos, por ejemplo insectos benéficos, aves, peces, entre otros (Broadhurst, 1998; Margni *et al.*, 2002; Mullin *et al.*, 2010; Paoletti y Pimentel, 2000; Williamson, 1998).

En años recientes las políticas reguladoras sobre el uso de pesticidas de Estados Unidos de Norteamérica y la Comunidad Europa han sufrido cambios radicales, lo que ha propiciado la cancelación o restricción de más del 50% de los ingredientes activos utilizados para la formulación de insecticidas, como los pertenecientes a los grupos de los Organofosforados y Carbamatos (Whalon y Wingerd, 2003). En las últimas décadas se han visto efectos adversos directos e indirectos en el hombre, causados por el uso inadecuado de estos productos, ya que se encuentran presentes como residuos en los alimentos, agua para beber (Tait, 2001), lagos (Peters *et al.*, 2001), lluvia (Suzuki *et al.*, 2003), aire, casas, suelos o superficies contaminadas, además de que se está en contacto permanente con ellos.

Por ejemplo en un estudio realizado en Estados Unidos de Norteamérica por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades reportan que en el monitoreo de 116 productos químicos, incluyendo 34 plaguicidas en sangre y orina en humanos; la población muestreada tenía 23 plaguicidas de los 34 estudiados. El 99% de la población tenía concentraciones detectables de DDT aún cuando este insecticida no se usa desde 1970. Al 93% se le encontraron

residuos de Clorpirifos, insecticida ampliamente utilizado en la agricultura y para el control de plagas urbanas, resultando los niños con las más altas concentraciones (hasta cuatro veces los límites permitidos). En promedio en la población muestreada se le detectaron 13 plaguicidas (Schaffer *et al.*, 2004). Además la exposición continua a estos productos está relacionada con el desarrollo de ciertas enfermedades como algunos tipos de cáncer y otras enfermedades crónicas como la de Parkinson's y Alzheimer's (Dich *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 2004; Schaffer *et al.*, 2004; Schechter *et al.*, 1997).

Otro problema es el rápido desarrollo de resistencia por los insectos hacia los diferentes grupos de insecticidas químicos, generalmente surge en un tiempo no mayor de 10 años después de la aparición en el mercado de un nuevo insecticida. Actualmente se reportan más de 500 especies de insectos plaga que han desarrollado resistencia a uno o más grupos de insecticidas químicos (Casida y Quistad, 1998; Georghiu y Lagunas-Tejeda, 1991; Guicherit *et al.*, 1999; Hoy, 1998; McCaffery, 1998; Pittendrigh y Gaffney, 2001; Whalon *et al.*, 2007). Lo que hace necesario 1) el incremento de las dosis, 2) uso de mezclas de dos o más productos y 3) realizar aplicaciones frecuentemente. Lo anterior mencionado incrementa los costos de producción (Broadhurst, 1998; Matsumura, 2004), los problemas de residuos, de contaminación, problemas de fitotoxicidad por la aplicación continua de estos productos (Oliveira *et al.*, 2001), inclusive en algunos casos el control es difícil o imposible, teniéndose pérdidas (de Maag *et al.*, 1999; Palumbi, 2001).

Sin embargo se sigue dependiendo del uso de los químicos para proteger nuestros cultivos de las plagas (Urech *et al.*, 1997), por lo que se requiere del desarrollo de alternativas para el control de las plagas que no sean perjudiciales para el hombre o ambiente. El control biológico es una alternativa que se utiliza frecuentemente para el control de plagas, incluye el uso de parasitoides y depredadores y el control microbiano que es el uso de entomopatógenos como hongos, nemátodos, bacterias y virus (Paoletti y Pimentel, 2000; Tanada y Kaya, 1993).

1. ANTECEDENTES

1.1. Control microbiano de insectos

Actualmente el uso de insecticidas biológicos (entomopatógenos) está teniendo un gran auge ya que su desarrollo y registro es barato, además de que el tiempo para desarrollar un nuevo producto es relativamente corto en comparación con los insecticidas químicos (Watkinson, 1994). Los microorganismos que son patógenos de insectos son muy diversos y entre estos tenemos una gran variedad de especies de virus, bacterias y hongos. Cada uno de estos subgrupos está integrado por un amplio espectro de organismos que varían en su modo de acción, sitio de reproducción y mecanismo de patogenicidad. Mientras que algunos entomopatógenos exhiben amplio rango de hospederos, muchos son específicos, así como selectivos hacia las larvas o adultos. Este rango probablemente refleja la relación en los medios naturales de algunos microorganismos en particular y los insectos, de su mecanismo de patogenicidad y las necesidades del patógeno (Aronson *et al.*, 1986; Ibarra *et al.*, 2006).

La comparación entre los entomopatógenos y los insecticidas químicos convencionales normalmente se basa en su eficacia y control de las plagas. Cuando se consideran los beneficios ambientales incluyendo seguridad para los humanos, otros organismos no blanco, reducción de residuos en alimento, aumento de actividad de otros enemigos naturales e incremento de la biodiversidad en los ecosistemas, sus ventajas son numerosas (Lacey *et al.*, 2001; Steinhaus, 1956). Actualmente existe un gran interés sobre el impacto de los entomopatógenos en los efectos sobre la dinámica poblacional de los insectos. Parte del incremento en el interés se debe a los avances tecnológicos en patología de insectos que han permitido descubrirlos en infecciones de insectos por virus, bacterias y hongos.

La importancia de los entomopatógenos ha sido enfatizada por los modelos de dinámica de poblaciones, los cuales han mostrado en cierto grado que las poblaciones de insectos pueden ser influenciadas y aún reguladas por los entomopatógenos (Briggs y Godfray, 1996; Lacey *et al.*, 2001; Lord, 2005). Además de que se pueden manipular genéticamente para mejorar sus efectos.

Las bacterias son los microorganismos más utilizadas en el control de insectos. Las bacterias Gram positivas han mostrado ser los patógenos más usados con propósitos de control biológico y son la base de la industria de los insecticidas microbianos (Priest, 2000). La mayoría de las especies son capaces de infectar y matar insectos sanos y otras son oportunistas, se multiplican rápidamente y tienen acceso a la hemolinfa del insecto huésped estresado a través de heridas o después de la infección. Un gran número de las especies de bacterias son capaces de infectar y matar insectos sanos, son bacilos formadoras de esporas. Para estas especies la hemolinfa de la larva insecto es un excelente medio nutritivo para su multiplicación y en algunos casos para la esporulación (Aronson *et al.*, 1986).

1.1.1. *Bacillus thuringiensis*

Entre los bacilos formadoras de esporas, la especie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es la más empleada a nivel mundial para el control de insectos plaga (Aronson *et al.*, 1986; Federici, 2005; Schnepf *et al.*, 1998). La bacteria *B. thuringiensis* se encuentra naturalmente asociada a insectos muertos o enfermos (de Maagd, 2002); varias subespecies o serotipos (*kurstaki*, *israelensis*, *tenebrionis*, etc.) han sido aisladas de cadáveres de insectos, aunque las epizootias son poco frecuentes (de Maagd *et al.*, 2003; Schnepf *et al.*, 1998). Generalmente la cepa aislada de un determinado insecto es tóxica hacia ese organismo, sin embargo existen excepciones (Damgaard, 2000).

El microorganismo bioinsecticida más ampliamente usado a nivel mundial y de mayor éxito es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), para el control de insectos plaga de plantas cultivadas, de zonas forestales o para combatir vectores de enfermedades (Crickmore, 2005; de Maagd *et al.*, 2003; Nester *et al.*, 2002; Schnepf *et al.*, 1998); representa una pequeña fracción del mercado de los bioplaguicidas (Porter *et al.*, 1993), con ventas anuales de alrededor de 140 millones de dólares norteamericanos, con más del 40% de las ventas en Estados Unidos de Norteamérica (National Academy of Sciences, 2003). El uso de *Bt* se está incrementado rápidamente debido a que no causa efectos adversos al hombre, ambiente, o a los organismos no blancos (Joung y Côté, 2000; Porcar *et al.*, 2010). Además, se puede combinar con otras técnicas de control de insectos plaga y es un componente fundamental en el Manejo Integrado de Plagas (Lacey y Shapiro-Ilan, 2008). Ha sustituido a insecticidas químicos que han sido prohibidos por causar problemas ambientales o de salud, que su uso está siendo eliminado progresivamente en áreas sensitivas del medio ambiente; en productos para consumo humano, de exportación, en los cuales se requiere que estén libres o con bajos niveles de residuos químicos. En la agricultura orgánica *Bt* es el principal bioinsecticida que utilizan los productores para el control de plagas de especies de Lepidoptera (Ferré y Van Rie, 2002; Forrester, 1994; Lacey *et al.*, 2001; National Academy of Sciences, 2003; Schnepf *et al.*, 1998; Whalon y Wingerd 2003; Zehnder *et al.*, 2007).

En México *Bt* es el bioinsecticida de mayor aceptación y empleo, se calcula que se aplica anualmente a 100 000 ha de maíz, 174 000 ha de algodón y 200 000 ha de hortalizas, sin embargo en el caso del maíz solo se utiliza en un 5% de la superficie total cultivada bajo condiciones de riego. Se estima que el empleo de *Bt* para el control de plagas oscila entre un 4 a 10% del total de insecticidas químicos empleados, por lo que se considera que es un mercado incipiente de bioinsecticidas (Benbrook, 2009b; Tamez-Guerra *et al.*, 2001).

Bacillus thuringiensis es un miembro del grupo *Bacillus cereus* que incluye las especies *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. mycoides*, la característica que distingue a *B. thuringiensis* de los otros miembros del grupo *B. cereus* son sus propiedades entomopatógenas (Bravo *et al.*, 2005). Esta bacteria produce una o más inclusiones paraesporales, también llamados cristales, durante la fase estacionaria, en cantidades que pueden ser hasta del 30% de la proteína total de la célula, son liberadas al medio con las esporas cuando la célula se lisa. Las inclusiones contienen varios tipos de protoxinas llamadas δ -endotoxinas (de Maagd, 2002; Koziel *et al.*, 1993; Li, *et al.*, 1996).

Las δ -endotoxinas son los factores mas significativos que determinan la toxicidad de esta bacteria hacia un amplio rango de especies de insectos e inclusive otros organismos como los nemátodos (de Maagd *et al.*, 2003). Las inclusiones pueden ser de forma bipiramidal, rectangular y plana, cuadrada, esférica, amorfa, etc., son visibles utilizando un microscopio compuesto (Figura 1). Los cristales poseen propiedades insecticidas, las cuales son específicas, aunque la bacteria puede producir otras proteínas insecticidas durante las diferentes fases de su desarrollo y compuestos extracelulares como: enterotoxinas, fosfolipasas, haemolisinas, proteinasas, proteínas insecticidas vegetativas, β -exotoxinas, bacteriocinas, proteínas de superficie y antibióticos que pueden contribuir a su patogenicidad (Aronson y Shai, 2001; Dulmage, 1981; Fast, 1981; Fedhila *et al.*, 2004; Hansen y Salamiou, 2000; Kubota *et al.*, 2006; Milner, 1994; Schnepf *et al.*, 1998) y además pueden funcionar como receptor, como es el caso de la proteína Cyt1Aa (Pérez *et al.*, 2005).

Bacillus thuringiensis fue aislada por primera vez en 1901 por S. Ishiwata de larvas enfermas de *Bombix mori* (L.), quien le dio el nombre de *B. sotto*, haciendo una descripción muy breve e incompleta. Diez años después Ernst Berliner aisló el mismo microorganismo de larvas enfermas de *Anagasta kuehniella* (Zeller) en Thuringia, Alemania, dándole en nombre de *Bacillus thuringiensis*, que es aceptado como el nombre científico original (Beegle y

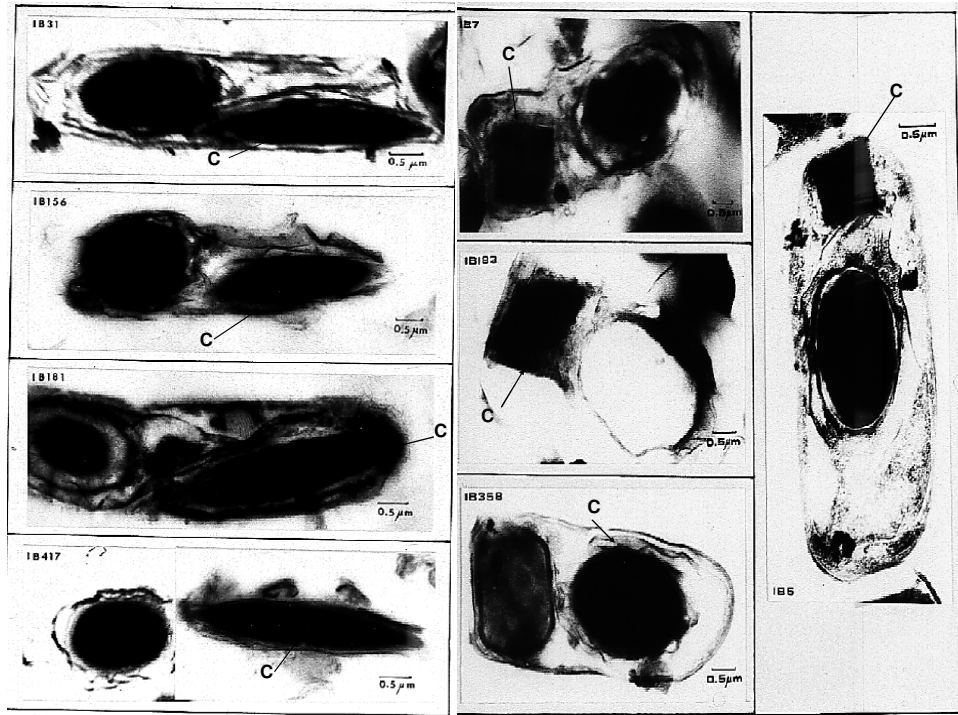


Figura 1. Diversas formas y tamaños de cristales producidos por *B. thuringiensis*: C, cristal. Tomado de Bravo *et al.*, 1998.

Yamamoto, 1992; Milner 1994). En 1915 Aoki y Chigasaki infectaron experimentalmente larvas de *B. mori* reproduciendo los síntomas de la enfermedad. Mattes en 1927 reisoló una cepa de *Bt* de *Ephestia* y realizó pruebas subsecuentes de campo de esta cepa sobre “El Barrenador Europeo del maíz”, dando resultados prometedores. Este trabajo llevó al desarrollo del primer producto comercial llamado “Sporine”, producido en Francia en 1938 (Milner, 1994).

La historia moderna de *Bt* inicia con la investigación pionera de Steinhaus en Estados Unidos de Norteamérica en 1950, quien creció la cepa Mattes en agar nutritivo y dejó que se secase a temperatura ambiente, luego resuspendió las esporas en agua y la aplicó en campo a bloques de alfalfa para el control de larvas del “Gusano de la Alfalfa” (*Colias eurytheme* Boisduval). En siete de los nueve bloques *Bt* redujo las poblaciones de las larvas, abajo del umbral económico en pocos días y las larvas enfermas presentaban síntomas

similares a las larvas infectadas artificialmente en laboratorio (Milner, 1994). Steinhaus determinó que *Bt* tenía potencial económico y poco después se encontró que el cristal era tóxico (Starnes *et al.*, 1993).

En 1959 se comercializó *Bt* por primera vez en Estados Unidos de Norteamérica, sin embargo la cepa utilizada no era muy patogénica (subespecie *thuringiensis*) y los resultados obtenidos fueron muy variados, no pudiendo competir con los insecticidas químicos. Pero Dulmage en 1970 aisló una cepa de *Bt* de una larva enferma de *Pectinophora gossypiella* (Saunders) que constituyó una nueva subespecie (*kurstaki*) conocida como HD1, la cual es base de una gran cantidad de productos comerciales contra lepidópteros. Esta cepa compite con los insecticidas químicos en eficacia y costo para el control de los insectos plaga, es de 20 a 200 veces más potente que las cepas comerciales existentes. La subespecie *kurstaki* es la que se comercializa en la actualidad y es tóxica a más de 90 especies de insectos plaga pertenecientes al orden Lepidoptera.

Otra subespecie *B. thuringiensis israelensis* es activa contra mosquitos y moscas negras, fue descubierta en 1977 por Margalit y Goldberg en Israel, es la cepa que se utiliza en todo el mundo para el control de mosquitos vectores de enfermedades.

En 1983 Krieg y colaboradores aislaron una cepa de *Bt* de *Tenebrio molitor* (L.) que es activa contra coleópteros, la cual es conocida como *B. thuringiensis* subespecie *tenebrionis*, produce un cristal cuadrado y delgado, la toxina es activa contra insectos de la familia Chrysomelidae, particularmente a *Leptinotarsa decemlineata* que es una de las principales plagas del cultivo de la papa en campo (Beegle y Yamamoto, 1992).

El descubrimiento de *B. thuringiensis tenebrionis* propició la búsqueda de nuevas cepas de *Bt* por diversos grupos a nivel mundial. Actualmente se han

reportado cepas de *Bt* que son activas a insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallophaga e inclusive de otros organismos como nemátodos, ácaros y protozoarios (de Maagd *et al.*, 2003; Feitelson *et al.*, 1992; Starnes *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 2003). Por lo que en años recientes se han encontrado cepas activas con rango más amplio de toxicidad hacia otras especies de plagas que amplía el uso de *Bt* más allá de los mercados tradicionales, además de la disponibilidad de nuevas toxinas para el uso de los agricultores y que podría reducir el riesgo de desarrollo de resistencia por las plagas (Bravo *et al.*, 2005; Feitelson, *et al.*, 1992).

A la fecha se han clonado y determinado la secuencia de más de 400 genes *cry* y estas proteínas han sido clasificadas en 51 familias y diferentes subclases (Figura 2). Los genes se han expresado en otros microorganismos y varias especies de plantas cultivadas (Crickmore *et al.*, 2010, http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

1.1.1.1. Plantas transgénicas

Sin lugar a dudas algunos de los mayores cambios, experimentados, actualmente en la agricultura, son: el control de insectos plaga, el desarrollo de plantas transgénicas de especies cultivadas resistentes a plagas y su introducción comercial en 1995 (Ferry *et al.*, 2004; Federici, 2005; Peferoen, 1997). Se han comercializado variedades de maíz, algodón, arroz resistentes a algunas especies de larvas de lepidópteros (Perlak *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2003) y papa a coleópteros, entre otros, que expresan una o dos toxinas Cry diferentes de *Bt*, lo cual ha beneficiado tanto a pequeños como a grandes agricultores (de Maadg *et al.*, 1999; Delmer, 2005; Ferry *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005). Se han cultivado de 1996 a 2008, 357 285 380 millones de acres en todo el mundo de plantas que expresan una o más toxinas de *Bt* (Benbrook, 2009a; Benbrook, 2009b).

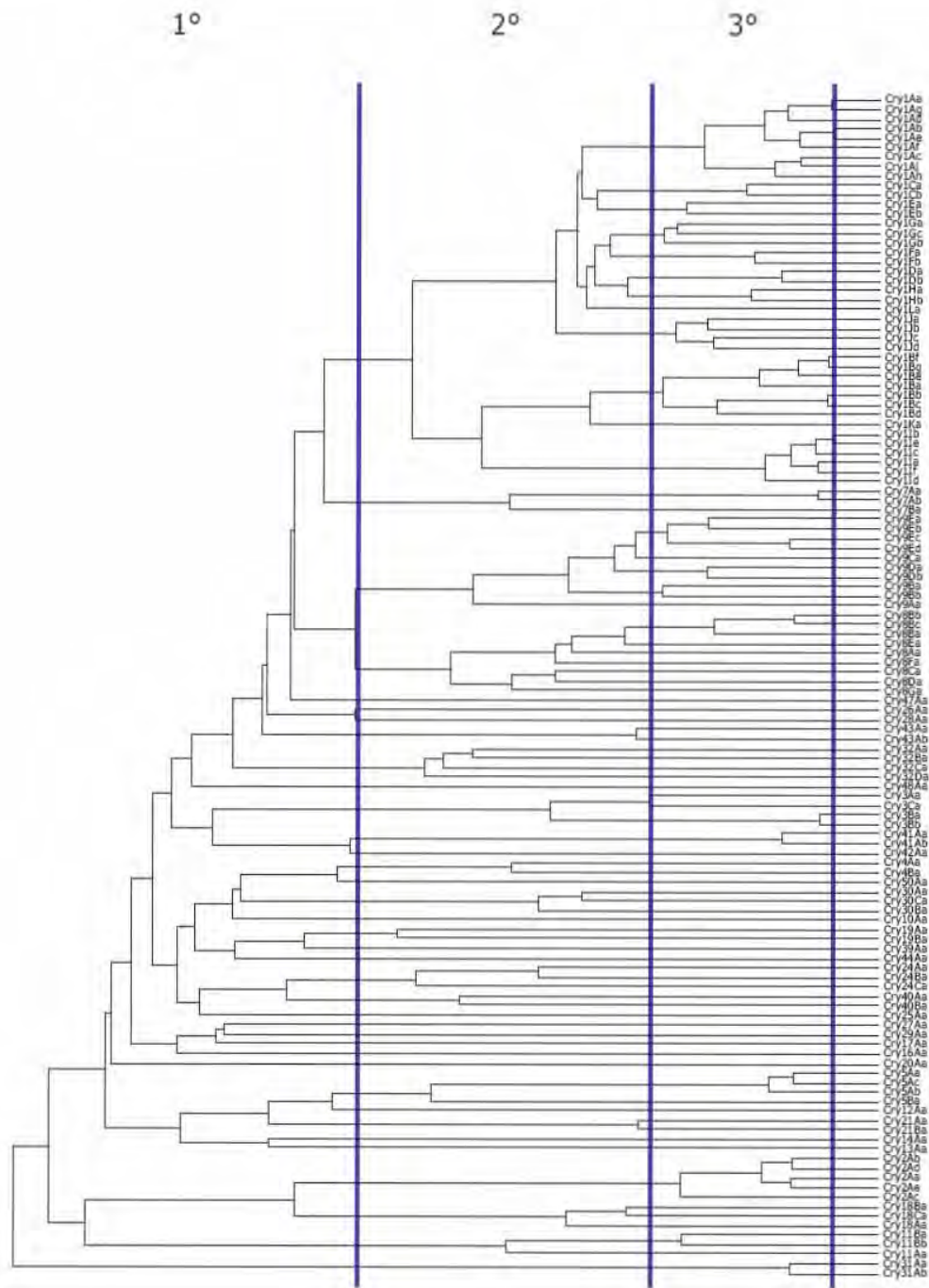


Figura 2. Proteínas Cry de tres dominios (Crickmore *et al.*, 2010. [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil%20Crickmore/Bt/index.html)).

Mezclas de *Bt* se han aplicado como aspersiones foliares sobre plantas desde hace más de 50 años, pero la toxina generalmente pierde su actividad insecticida en el medio ambiente en pocos días y no es sistémica. Algunas veces se requieren de aplicaciones continuas para controlar las plagas o bien las toxinas no entran en contacto directo con insectos de diferentes hábitos alimenticios como: chupadores, raspadores o barrenadores (de Maadg *et al.*, 1999).

En los cultivos transgénicos la toxina es producida continuamente por la planta, evitando la aplicación frecuente de productos a base de *Bt*. Por lo tanto la proteína está protegida de la acción de los elementos del medio ambiente, manteniendo su actividad insecticida durante todo el tiempo que dura el cultivo, protegiéndola en las etapas de desarrollo que es susceptible. Lo cual permite que el estadio más sensitivo de la plaga comience a alimentarse desde un principio. La plaga al alimentarse ingiere la toxina, la que le causa la muerte o incrementa el tiempo de desarrollo, pudiendo ser más susceptible al ataque de parasitoides y depredadores (Perlak *et al.*, 1990). Inclusive, la toxina es generalmente expresada en todas las partes de la planta, incluyendo tejidos internos, que difícilmente serían protegidos por los insecticidas químicos. La producción interna de la toxina protege a la planta del daño causado por insectos barrenadores. Las primeras plantas transgénicas que expresan toxinas Cry para el control de ciertas especies de insectos plaga se cultivaron en 1995 en Estados Unidos de Norteamérica, desde entonces la superficie y los países donde actualmente se cultivan se han incrementado año con año, como resultado de los beneficios obtenidos por los agricultores.

Muchos agricultores están cultivando plantas transgénicas porque tienen un mejor control de las plagas y/o porque los costos de control son más bajos que con los métodos convencionales (insecticidas químicos). También se han reducido las cantidades de insecticidas químicos previamente utilizados en estos cultivos. Lo cual produjo beneficios adicionales; como menor exposición

por parte del hombre y otros organismos a éstos productos, menos contaminación de aire y agua e incremento en las poblaciones de los insectos benéficos (Benbrook, 2009a; Delmer, 2005; Duan *et al.*, 2008; Federici, 2005; National Academy of Sciences, 2003; Pretty, 2001; Romeis *et al.*, 2006).

Desde hace 10 años en la República Mexicana, se cultiva algodón que expresa proteínas Cry activas a *Helicoverpa zea*, *Heliiothis virescens* y *Spodoptera frugiperda*, especies de lepidópteros presentes en las regiones donde se siembra algodón. Antes de la introducción del algodón transgénico se aplicaban 14 kg de ingrediente activo de insecticidas químicos por hectárea para el control de las plagas antes mencionadas, actualmente se aplican alrededor de 2 kg de ingrediente activo por hectárea, reduciendo el uso de insecticidas químicos en un 80%. El área cultivada es de alrededor del 30% de la superficie total, se siembra en los estados de Sonora, Chihuahua, Baja California, Coahuila, Durango, Tamaulipas y Sinaloa (James, 2005).

Sin embargo aún con los beneficios generados por esta nueva tecnología para mejorar la calidad y disponibilidad de productos agrícolas, existe preocupación por parte del público en general y de científicos, sobre posibles efectos adversos al ambiente, organismos no blanco, salud del hombre (Conner *et al.*, 2003; Morin, 2008; Nap *et al.*, 2003; Pretty, 2001; Serageldin, 1999; Spiroux de Vendômois *et al.*, 2009), economía de los agricultores (Benbrook, 2009b) y resurgimiento de plagas secundarias (Lu *et al.*, 2010). Lo cual hace necesario la aplicación de insecticidas químicos para su control (Shelton *et al.*, 2002).

Algunos autores consideran que la reducción en el uso de insecticidas químicos sólo se ha manifestado en algodón (Benbrook, 2004; Cattaneo *et al.*, 2006; Shelton *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Por ejemplo para el control de larvas de lepidópteros del complejo *Helicoverpa zea* y *Heliiothis virescens*, en China, con el cultivo de algodón transgénico redujo hasta en un 60%-80% el

número de aplicaciones foliares y en Estados Unidos de Norteamérica de 4.1 aplicaciones que se realizaban en los años 1992 a 1995 se redujeron a 0.8 en el período 1999-2001 (Romeis *et al.*, 2006) y en maíz ha tenido poco o ningún impacto. Sin embargo según Benbrook (2004) la reducción en el uso de insecticidas químicos durante los primeros tres años de la introducción de variedades de plantas que expresan toxinas de *Bt*, si lo hicieron, pero, a partir de 1999 ya no se generó tal disminución. Debido al resurgimiento de plagas secundarias, generalmente insectos chupadores, que antes eran controladas con la aplicación de insecticidas para el control de larvas de lepidópteros (Cattaneo *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2010).

También se ha observado bajo condiciones de laboratorio que larvas de una colonia de *P. xylostella* resistentes a la toxina Cry1Ac, pueden usar esta proteína como suplemento alimenticio y esto se manifestó en un desarrollo más rápido (dos días) en presencia de la proteína, en relación al control (Sayyed *et al.*, 2003).

Se cree que la presencia continua de la toxina de *Bt* en las plantas y por lo tanto la exposición permanente de la plaga podría generar rápidamente el desarrollo de insectos resistentes a *Bt*, además de que pudiese tener efectos adversos en organismos no blanco (de Maagd, 2002; Mckee, 2003; Pretty, 2001). Sin embargo existen pocos reportes sobre la aparición en campo de especies de insectos plaga resistentes a las proteínas aún cuando ya han pasado 15 años desde que se cultivaron las primeras plantas que expresan proteínas Cry (Bagla, 2010; Ferre y Van Rie, 2002; Mahon *et al.*, 2008; Tabashnik *et al.*, 2009). Esto puede ser debido a las medidas tomadas en campo, es decir el uso de cultivos refugio, para evitar el desarrollo de poblaciones de insectos heterocigotos resistentes (Frutos *et al.*, 1999; Tabashnik, 2007; Tabashnik *et al.*, 2009).

1.1.1. 2. Resistencia de insectos plaga a δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*

Actualmente las proteínas Cry se aplican en grandes cantidades para combatir los insectos plaga principalmente en los cultivos de algodón, maíz, crucíferas, para el control de vectores de enfermedades como mosquitos y moscas negras, en varios países (Bravo *et al.*, 2005; Schnepf *et al.*, 1998).

Los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* se han aplicado en campo desde principios de 1960 y a la fecha sólo la “Palomilla del dorso de diamante” *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) ha desarrollado resistencia en campo, en diferentes partes del mundo (Tabashnik *et al.*, 1990; Tabashnik, 1994; Tabashnik *et al.*, 1997).

Poblaciones de “El falso medidor” *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) que son plaga de vegetales cultivados bajo invernadero en Columbia Británica en Canadá, desarrollaron resistencia debido al uso excesivo de *Bt* y a la presencia de múltiples generaciones que se traslapan durante todo el año (Janmaat y Myers, 2003).

La forma en que el organismo puede evitar la acción de la toxina probablemente se debe a los siguientes factores: solubilización defectuosa, activación proteolítica deficiente, demasiada proteólisis (degradación de la toxina), atracción de las moléculas de la toxina hacia sitios de unión no funcionales, formación defectuosa del poro y reparación rápida de las células (Griffitts y Aroian, 2005).

Cambios en el procesamiento proteolítico

La activación de la proteína por las proteasas es el primer paso para la activación de la toxina. En varios casos, la parte media del C terminal de la protoxina es indispensable para una activación completa y se ha demostrado

que cortes específicos en el N-terminal son necesarios para la actividad de la toxina (Bravo *et al.*, 2002)

Modificación de los sitios de unión

El primer reporte que demostró sobre un cambio bioquímico de una población de insectos resistente fue de *Plodia interpunctella*, seleccionaron la población resistente en laboratorio, la afinidad de unión de la toxina Cry1Ab se afectó hasta 50 veces. Los resultados también mostraron que esta población era resistente a la toxina Cry1Ca y se unía con alta afinidad a un sitio distinto de unión. Estos resultados demostraron una conexión entre la unión al receptor y la resistencia. En 1991 Ferré y colaboradores, de una población de la “Palomilla del dorso de diamante” (*P. xylostella*) reportada como resistente a *Bt* comercial (Dipel) encontraron que era hasta 200 veces más resistentes a la toxina Cry1Ab, que la población susceptible criada en laboratorio. Lo cual es debido a la baja capacidad de unión de la toxina a su receptor, pudiendo deberse a una disminución en la concentración del receptor, disminución por la afinidad al receptor o a ambos. Los receptores que se han determinado son aminopeptidasas, fosfatasa alcalina, caderinas, glicolípidos y una glicoproteína glicolisada de alto peso molecular.

1.1.1.3. Protoxinas de *B. thuringiensis*

Las δ -endotoxinas

La mayoría de los genes que codifican las δ -endotoxinas se encuentran en plásmidos, existen cientos de subespecies de *Bt* y la mayoría produce, principalmente durante la esporulación, uno o más inclusiones paraesporales, pudiendo tener una o varias protoxinas insecticidas, cada una de estas protoxinas es activa a un grupo de larvas de al menos tres órdenes de insectos (Aronson y Shai, 2001; Schnepf *et al.*, 1998). Debido a su especificidad las

subespecies de *Bt* son generalmente activas a un amplio rango de especies, normalmente dentro del mismo orden (Aronson y Shai, 2001).

Nomenclatura de las δ -endotoxinas

Según Hofte y Whiteley para 1989 se habían reportado la secuencia de nucleótidos de 42 genes de proteínas Cry, varias secuencias eran idénticas o casi idénticas y por lo tanto representaban el mismo gene o ligeras variantes del mismo. Propusieron un esquema de clasificación de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* basado en una combinación de su secuencia deducida de aminoácidos y la actividad biológica. En esta clasificación 38 toxinas fueron colocadas en 14 clases distintas.

En 1998 Crickmore y colaboradores propusieron una nueva nomenclatura de los genes *cry* y *cyt* (Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore, 2000) basada solamente sobre la relación de la secuencia entre las toxinas. El nuevo sistema de nomenclatura se basa en la asignación de nombres a los miembros de superfamilias de genes de acuerdo a su grado de divergencia evolutiva estimada por árboles filogenéticos. Este cambio de una nomenclatura sustentada en secuencia y actividad, a una basada en la secuencia permite que proteínas relacionadas cercanamente se agrupen y evita la necesidad de los investigadores de realizar bioensayos con cada proteína nueva contra un gran número de especies blanco antes de asignarle un nombre. En esta nueva nomenclatura los números arábigos en el primer rango, es dado a una proteína si comparte menos del 45% de identidad con todas las demás proteínas Cry. La letra mayúscula (segundo rango) se asigna a las proteínas que comparten menos del 78%, pero más del 45% de identidad con un grupo particular de proteínas Cry. El tercer rango es una letra minúscula es dado para distinguir las proteínas que comparten mas del 78% pero menos 95% de identidad. Finalmente un número es asignado a proteínas que comparten más del 95% de

identidad, pero que no son idénticas y que deben ser consideradas variantes de la misma proteína (Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 2000).

Las proteínas Cry se definen como una inclusión paraesporal (cristal) proteica de *B. thuringiensis* que muestra alguna actividad tóxica al organismo blanco y que es experimentalmente comprobable o cualquier proteína que posee una secuencia similar a una proteína Cry conocida. En el caso de las Cyt se les define como una inclusión paraesporal proteica (cristal) de *B. thuringiensis* que muestra actividad hemolítica o cualquier proteína que tenga una secuencia parecida a alguna proteína Cyt conocida (de Maagd *et al.*, 2003).

1.1.1.4. Modo de acción de las toxinas Cry1

Los insectos deben de ingerir los cristales junto con el alimento, lo cual es una desventaja, comparado con los insecticidas de contacto. Los cristales son disueltos por el pH alcalino y el ambiente reductor del jugo del intestino del insecto. Los polipéptidos liberados del cristal representan las protoxinas y no tienen ninguna actividad biológica. El peso molecular de las protoxinas puede ser de 70 o 130 kDa. Luego, el paso más decisivo es la activación proteolítica de la protoxina (Bravo *et al.*, 2002). En el caso de las toxinas activas a lepidópteros la activación incluye las serina proteasas, siendo una de sus funciones principales la digestión de los alimentos en el intestino medio de la larva. Las serina proteasas cortan aproximadamente 600 aminoácidos de las protoxinas en C-terminal en un polipéptido bien definido a casi la mitad de su tamaño original (60 kDa). Además 29 aminoácidos son removidos del N-terminal. La toxina activada (monómero) muestra considerable estabilidad a la degradación proteolítica posterior (Luthy y Wolfersberger, 2000).

El monómero de la toxina se une con los receptores anclados por GPI fosfatasa alcalina y aminopeptidasa, luego se une a caderina, lo cual causa un cambio conformacional de la toxina y facilita un corte proteolítico de la hélice α -

1, por una proteasa de membrana, lo que permite la formación del oligómero de la toxina, lo que conlleva cambios conformacionales, aumentando su afinidad por aminopeptidasa y fosfatasa alcalina y receptores anclados por GPI. Las toxinas se insertan irreversiblemente sobre la membrana plasmática de la célula. Se forma un poro, lo cual rompe la permeabilidad de la membrana, entra agua, iones, entre otros, la célula se hincha y se rompe (Figura 3). La hemolinfa fluye hacia el intestino medio, las esporas germinan y finalmente el insecto muere por hambre o septicemia (Arenas, 2010; Bravo *et al.*, 2004; Knowles y Dow, 1993; Pacheco *et al.*, 2010).

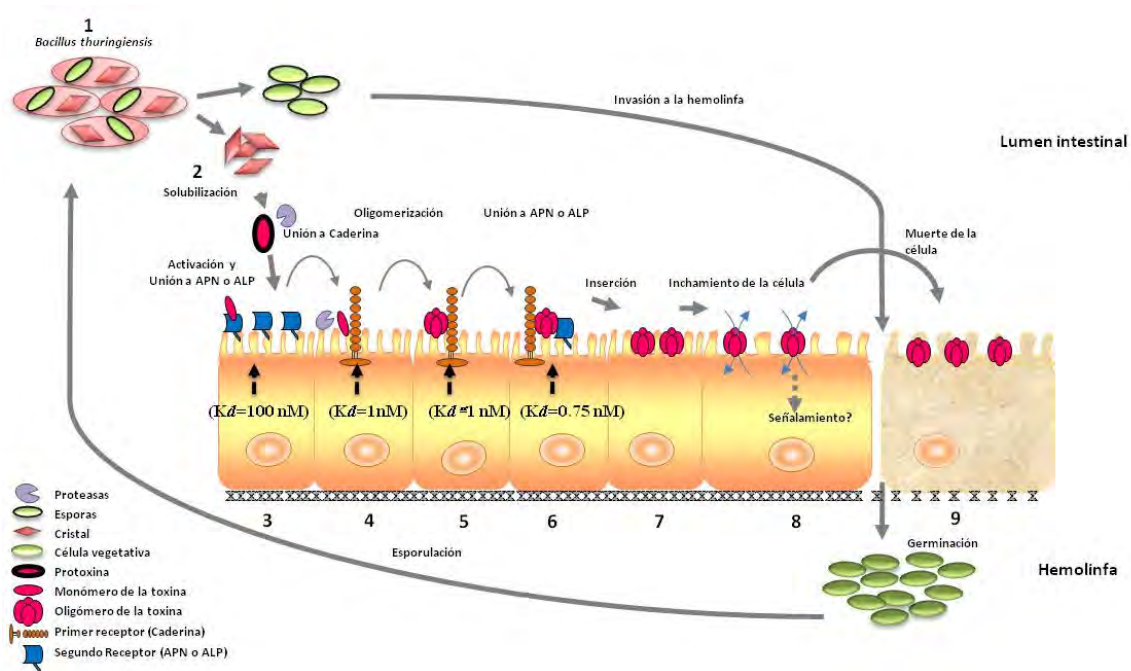


Figura 3. Modo de acción de las toxinas Cr1. 1) El insecto ingiere las esporas y cristales; 2) Los cristales son solubilizados; 3) Activación proteolítica de la toxina, el monómero se une a los receptores anclados por GPI Aminopeptidasa o Fosfatasa alcalina; 4) La toxina se une al receptor Caderina y sufre un corte proteolítico de la α hélice 1; 5) Lo que permite la formación del oligómero que sufre cambios conformacionales; 6) El oligómero se une con una alta afinidad a los receptores Aminopeptidasa o Fosfatasa Alcalina anclados a GPI; 7) la toxina se inserta, se forma el poro; 8) Ocurre un desbalance osmótico; 9) La célula muere y se rompe, las esporas entran en contacto con la hemolinfa, germinan y el insecto muere (Pacheco *et al.*, 2009).

Los síntomas externos después de la ingestión de los cristales por parte de la larva es que deja de alimentarse, luego la excreción del contenido intestinal, después una parálisis general la cual puede durar varias horas e inclusive días. La larva pierde peso y comienza a encogerse debido a la pérdida de líquidos. Con frecuencia la infección de la hemolinfa por la bacteria inicia después de la muerte del insecto (Whalon y Wingerd, 2003).

1.1.1.5. Estructura tridimensional

Las proteínas de tres dominios incluyen las que son tóxicas a especies de los órdenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera, así como a nemátodos. Estas proteínas Cry generalmente tienen dos longitudes (aproximadamente 130 o 70 kDa). El alineamiento de las secuencias de las toxinas activas muestra la presencia de hasta 5 bloques conservados. Se ha propuesto que las proteínas Cry que poseen estos bloques pudieran compartir estructuras similares (de Maagd *et al.*, 2001).

Las estructuras cristalinas de las toxinas activadas Cry1Aa (Figura 4) (Grochulski *et al.*, 1995), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry3Bb1 (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2006), Cry8AEa1 (Gou *et al.*, 2009) y una protoxina corta (Cry2Aa) (Morse *et al.*, 2001) se han determinado y confirmado su estructura de tres dominios bastante conservadas estructuralmente, aun cuando su secuencia es poco parecida. El dominio I, es un grupo de 7 α -hélices donde la hélice α -5 está completamente rodeada por seis hélices anfipáticas externas. A este dominio se le ha relacionado con la formación del poro. El dominio II consiste de tres hojas β antiparalelas, comparten una topología con una conformación de una llave Griega, formando un prisma β . Este dominio juega un papel importante con la interacción con el receptor. Finalmente el dominio III es un β sandwich de dos hojas β antiparalelas en una conformación de una formación de jellyroll y está implicado con la unión al receptor y

adicionalmente tiene implicación en la formación del poro (de Maagd *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1991).

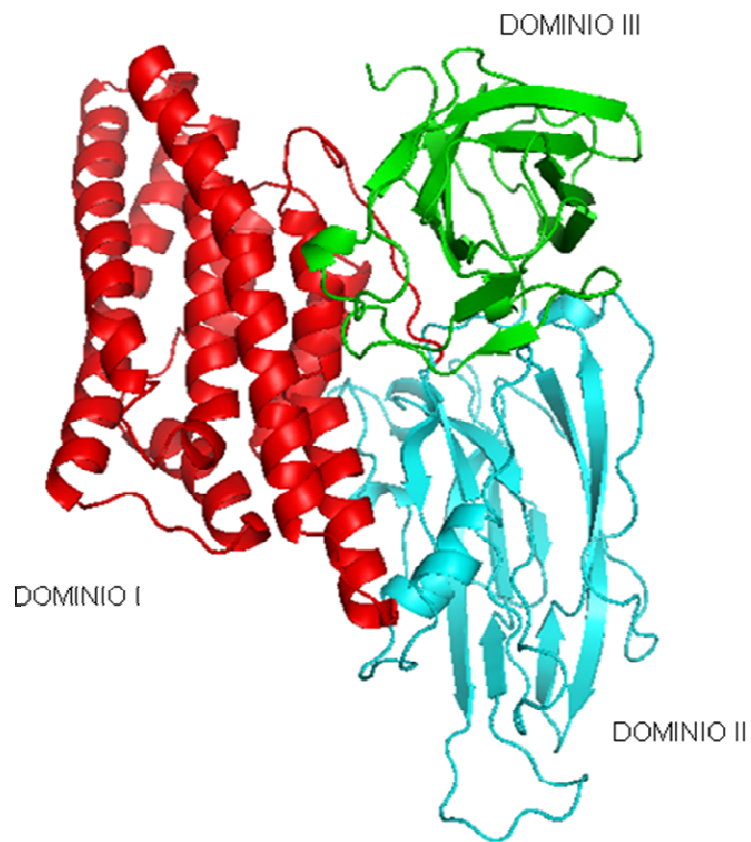


Figura 4. Estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995).

1.1.1.6. Las toxinas citolíticas de *B. thuringiensis*

Las toxinas citolíticas (Cyt) son un subgrupo (Figura 5) de las toxinas del cristal de *B. thuringiensis*, se les conoce así porque éstas poseen una actividad citolítica general *in vitro*, aunque muestran actividad específica *in vivo* contra dípteros. No tienen analogía en la secuencia de aminoácidos con la familia de las δ -endotoxinas de las proteínas Cry (Butko, 2003). La estructura de uno de los miembros (Cyt2Aa) se ha resuelto y muestra un dominio único de tres capas α - β proteína con un sólo plegamiento. Actualmente se proponen dos mecanismos de acción para estas toxinas: interacción directa con lípidos de membrana, insertándose en la membrana y formando poros destruyendo la membrana por una interacción parecida a la de detergente menos específica. Sin embargo se conoce bien su actividad sinérgica a otras toxinas contra otros insectos, en la cual se facilita la unión y quizás la internalización de las proteínas que sinergiza (de Maagd *et al.*, 2003). Además, Pérez y colaboradores (2005) demostraron que Cyt1Aa funciona como receptor de Cry11Aa utilizando vesículas de membrana de *Aedes aegypti*. Lo cual sugiere que es por esto que ninguna especie de mosquito ha desarrollado resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* subespecie *israelensis* en campo, aún cuando esta cepa se ha aplicado por más de 20 años para el control de mosquitos en diferentes partes del mundo.

1.1.1.7. Proteínas insecticidas vegetativas

Las proteínas insecticidas vegetativas (vip, siglas en inglés) son producidas durante la fase vegetativa, son solubles y no tienen homología con las proteínas de cristal y citolíticas. Han mostrado amplio espectro insecticida hacia especies plaga de Lepidoptera y Coleoptera. La actividad es a nivel del intestino medio, donde se unen a las células epiteliales, seguido de una degeneración progresiva de la cubierta epitelial. Lo cual se observa como un aclaramiento del intestino y hay interrupción en la alimentación (Lee *et al.*,

2003). Las proteínas insecticidas vegetativas se clasifican en tres familias: Vip1, Vip2 y Vip3. La Vip1 y 2 son componentes de una proteína binaria producidas por *B. cereus* y son activas contra coleópteros de la familia Chrysomelidae, particularmente a *Diabrotica virgifera virgifera* y a *D. longicornis* (Rang *et al.*, 2005) y las Vip3A a lepidópteros como *Agrotis ipsilon*, *S. frugiperda*, *S. exigua*, *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) (Estruch *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997).

1.1.1.8. Proteínas binarias

Las familias Cry34 (14kDa) y Cry35 (44kDa) fueron aisladas de cepas de *Bt* activas a *D. virgifera virgifera* (Ellis *et al.*, 2002). Las proteínas de cada familia son necesarias para que tengan efectos letales y por eso se les conoce como proteínas binarias insecticidas de cristal (Figura 5). Los síntomas que se visualizan en las larvas de *D. virgifera virgifera* se observan en el epitelium del intestino medio. Las proteínas Cry34 no está relacionada con otras proteínas Cry, sin embargo, las Cry35 son homólogas con las proteínas binarias de *B. sphaericus* con un 26 a 29% de identidad a la mayoría de la secuencia, así como poseen varios de los elementos de secuencia conservados (de Maagd *et al.*, 2003).

1.1.1.9. Proteínas relacionadas a Mtx2/3

La proteína Cry 15Aa de *B. thuringiensis* subespecie *thompsoni* tiene una homología significativa a las Mtx2 y Mtx3 de *B. sphaericus*. Es tóxica a larvas de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) y se encuentra en cristales asociada a una segunda proteína aparentemente no relacionada de un peso molecular de 40 kDa. La proteína de 40 kDa no tiene actividad y tampoco afecta la toxicidad de la Cry15A hacia *M. sexta*, pero sinergiza la actividad de Cry15A hacia *Cydia pomonella*. De *B. thuringiensis* subespecie *dakota* se aislaron dos proteínas con un 37% de identidad a la Cry15A y a la proteína de 40 kDa. Los

genes que codifican estas dos proteínas, *cry33Aa* y *cryNT32* se encuentran en un operón. La proteína Cry35 se aisló de la cepa *B. thuringiensis* subespecie *cameroum*, también pertenece al grupo homólogo de las Mtx2/Mtx3 junto con la Cry35, la cual es homóloga a la de 40 kDa y la CryNT32. La Cry38, de la que no se le conoce actividad, cuyo gene se encuentra asociado con los que codifican las Cry34 y Cry35 y la Cry23A, también producidas por *Bt*. La proteína Cry23A tiene un peso de 29kDa y es activa a ciertas especies de coleóptera como *Anthonomus grandis*, sólo en asociación con la proteína Cry37 de 13-14kDa (de Maagd *et al.*, 2003) (Figura 5).

1.1.1.10. Proteínas de superficie (S-layer)

Las proteínas de superficie (S-layer) son unas estructuras ordenadas de partículas cristalinas proteicas, las cuales cubren completamente la superficie de muchas archaea y eubacteria (Beveridge *et al.*, 1997; Sara y Sleytr, 2000) y constituyen del 5 al 10% de la proteína total de la célula. La función de estas proteínas de la cubierta de la superficie no se ha definido completamente, se ha propuesto que estas proteínas están envueltas en la integridad de la célula y el mantenimiento de la forma (Beveridge *et al.*, 1997). También, se ha hipotetizado que pueden estar involucradas con el intercambio de macromoléculas con el medio ambiente debido a que éstas son la capa más externa de la cubierta de la célula. En algunas bacterias patógenas, se les ha asociado con la virulencia (Beveridge *et al.*, 1997; Pei y Blazer, 1990).

En *B. cereus*, la cubierta de superficie promueve las interacciones con los leucocitos humanos con el huésped, contribuyendo a la patogenicidad (Kotiranta *et al.*, 1998). En *B. anthracis* se propuso que la cubierta de superficie proteica y la cápsula pueden cooperar en la interacción con el huésped (Mignot *et al.*, 2002).

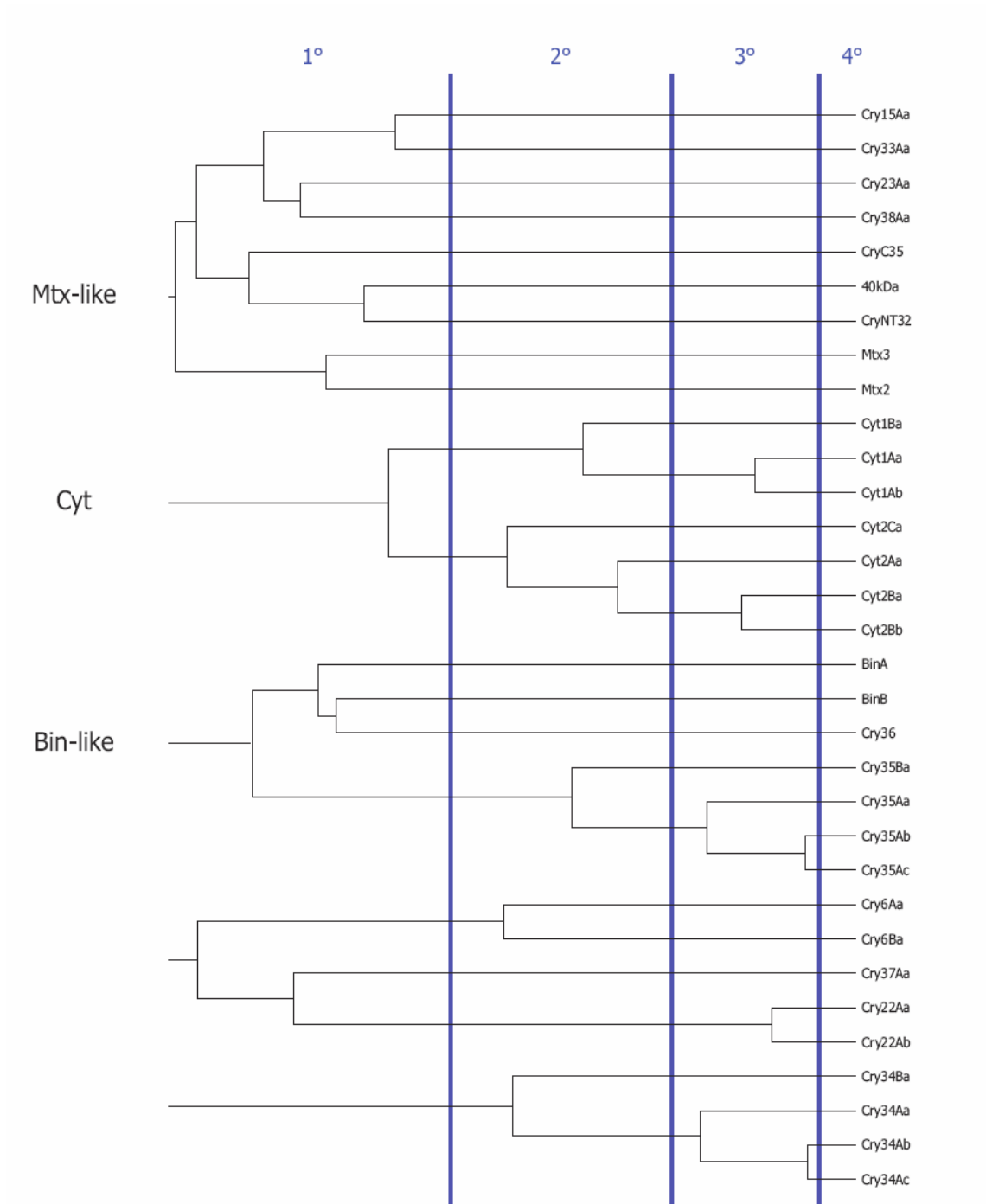


Figura 5. Otras proteínas insecticidas producidas por *B. thuringiensis* (Tomado de Crickmore *et al.*, 2010. <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/NeilCrickmore/Bt/index.html>).

Se clonaron varios genes que codifican para las proteínas de superficie y la secuencia de sus aminoácidos reveló baja similitud excepto en el dominio de anclaje a la pared celular (SLH: S-Layer Homology), el cual está implicado en la unión de estas proteínas al peptidoglicano unido al polisacárido (Sara y Sleytr, 2000). Por lo tanto diferentes tipos de proteínas de superficie pueden tener diferentes funciones. Las proteínas de superficie de las especies de *Bacillus* poseen un peso molecular entre 66 y 225 kDa. En *B. anthracis* se han descrito dos proteínas de superficie diferentes, Sap y EA1 (Mignot *et al.*, 2002). La presencia de estas proteínas no es requisito para la encapsulación normal del Bacilo (Mensnaje *et al.*, 1998). Estas proteínas aparecen secuencialmente en el crecimiento de la bacteria, de manera dependiente de la fase de crecimiento. La síntesis de Sap se presenta en la fase vegetativa, y la de EA1 durante la fase de esporulación (Mignot *et al.*, 2002).

En *B. thuringiensis* subespecie *galleria* se ha descrito una proteína de superficie (SlpA), la cual es similar a la Sap de *B. anthracis*. Se construyó una mutante interrumpiendo el gene correspondiente y se vio que no se expresa ningún otro tipo de proteína de superficie en esta bacteria (Mensnaje *et al.*, 2001). Una proteína de superficie diferente nombrada CTC fue descrita de *B. thuringiensis* subespecie *finitimus* (número de acceso AY460125), esta proteína es similar a EA1 de *B. anthracis* (Sun *et al.*, 2001). El peso molecular de la proteína CTC es de 100 kDa y forma cuerpos de inclusión esféricos durante la fase de crecimiento de la esporulación. La función de las proteínas de superficie de *B. thuringiensis* sobre la virulencia contra insectos plaga no se ha descrito.

1.1.2. Importancia de la búsqueda de nuevas toxinas

Se han secuenciado más de 400 genes *cry* y cada proteína es activa solo a una o pocas especies de insectos plaga. Es necesario continuar con la búsqueda de nuevas proteínas de *Bt* con mayor actividad insecticida (Yamamoto y Dean, 2000). Existen cepas de *Bt* activas contra ácaros,

nemátodos, protozoarios y tremátodos, sin embargo poco se sabe de su uso práctico, además muchas especies de insectos no son susceptibles a las proteínas Cry, como pulgones (Homoptera: Aphididae) y mosquitas blancas (Homoptera: Aleyroridae) que son especies plaga de importancia mundial, y que son vectores de enfermedades causadas por virus y han desarrollado resistencia a la mayoría de los insecticidas químicos (de Maagd *et al.*, 1999). También, para evitar el desarrollo de resistencia con el uso alternativo de toxinas o para controlar las especies que han desarrollado resistencia a algunas toxinas de *Bt*.

1.2. *Epilachna varivestis* Muls. (Coleoptera: Coccinellidae) una plaga de frijol importante

El frijol es uno de los cultivos más importantes en México, es un alimento básico en la dieta diaria por el aporte de proteínas. Sin embargo durante su desarrollo la planta, es atacada por plagas, siendo la más perjudicial la “Conchuela del frijol” (*Epilachna varivestis*). Este coleóptero posee metamorfosis completa, huevo, larva, pupa y adulto (Figura 6), la hembra ovíparosita de 500 a 600 huevecillos en toda su vida, en el envés de las hojas en grupos de entre 30 y 40. Las larvas y adultos se alimentan del follaje, dejando solo las nervaduras, llegando a defoliar completamente las plantas y en ocasiones las flores y las vainas, causando pérdidas totales sino se controla esta plaga (de la Paz *et al.*, 1975; Michels y Burkhardt, 1981). Además, de que los adultos son capaces de transmitir virus que causan enfermedad en las plantas como “El virus del mosaico del sureste” y “El virus del moteado de la vaina” que los adquieren los adultos cuando se alimentan de plantas enfermas. Las partículas virales son retenidas en el intestino anterior del insecto, no entran en la hemolinfa y no se reproducen en él. Sin embargo el adulto infecta plantas sanas con los virus cuando se alimenta y regurgita (Musser *et al.*, 2003).

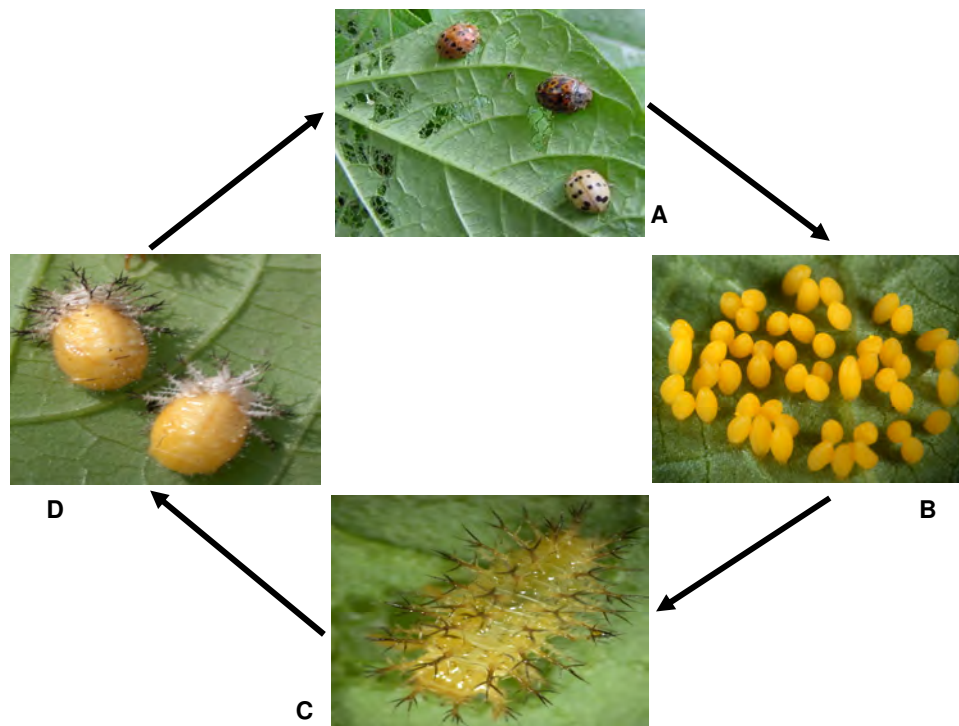


Figura 6. Ciclo biológico de *Epilachna varivestis*. A adultos; B huevos; C larva y D pupas.

“La conchuela del frijol” se originó en México y se encuentra distribuida desde Honduras hasta el oeste de Estados Unidos de Norteamérica. También, se introdujo en Japón y África, sobrevive la época de secas en forma de adulto, el cual entra en dormancia y en verano con el inicio de la temporada de lluvias el adulto emerge. Su control se basa en el uso de insecticidas químicos (Dobrin y Hammond, 1983; Tenorio y Carrillo, 1987). Sin embargo, éstos afectan a la entomofauna benéfica, propiciando el resurgimiento de plagas secundarias y puede haber una reinfestación hacia los campos tratados con insecticidas por adultos inmigrantes de otros campos, ya que los efectos residuales de los insecticidas duran en promedio 21 días (Dobrin y Hammond, 1983). La mayoría de los insecticidas tienen poco efecto sobre los huevos y pupas por lo que la población de insectos puede seguir creciendo y necesitarse otras aplicaciones,

incrementándose los costos de producción y daños a la entomofauna benéfica (Bor, 1997; Dobrin y Hammond, 1983), por lo que el uso de la bacteria entomopatógena *B. thuringiensis* puede ser una alternativa de control para esta plaga.

1.3. Uso de *B. thuringiensis* en el control de *E. varivestis*

Cantwell y Cantello (1982) reportan la actividad de *B. thuringiensis* Berliner en larvas neonatas de *E. varivestis*, de pruebas de laboratorio y de campo. La cepa de *Bt* que evaluaron produce β -exotoxina, crecieron la cepa en medio de cultivo líquido, centrifugaron las esporas y cristales, recuperaron el sobrenadante, el cual lo esterilizaron a 120° C durante 15 minutos. Con el producto estéril hicieron bioensayos, para lo cual utilizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} que se aplicaron a hojas de frijol. Se pusieron 20 larvas neonatas de la conchuela del frijol para que se alimentaran y como control utilizaron agua asperjada sobre el follaje. Las esporas se aplicaron sobre las hojas de frijol a una concentración de 36×10^9 unidades, se dejó que se secaran y luego se pusieron 20 larvas neonatas de *E. varivestis*. Las mismas diluciones de la β -exotoxina, pero incluyendo las esporas y cristales se evaluaron en campo, realizando aplicaciones cada siete días. Los resultados que obtuvieron en las pruebas de laboratorio fueron que con la dilución de 10^{-2} a los 7 días se tuvo un 100% de mortalidad. En campo con la dilución 10^{-2} se produjo el 100% de mortalidad de las larvas a los siete días y con las diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} se incremento el rendimiento de grano en forma substancial en comparación con el testigo. Concluyen que la β -exotoxina es la causante de la muerte de las larvas neonatas de *E. varivestis* en laboratorio y campo.

Chilcott y Wigley (1994) citan que Slaney y colaboradores en 1991 reportan que una cepa de *B. thuringiensis* var. *kumamotoensis* es tóxica a la conchuela del frijol, sin hacer mención del tipo de proteína que causa esta toxicidad.

La β -exotoxina también es tóxica a vertebrados y al hombre, ya que es análoga del ATP estructural (Sebesta *et al.*, 1981), por lo cual sería deseable contar con una proteína tóxica a *E. varivestis* e inocua a otros organismos no blanco, incluyendo al hombre.

2. HIPOTESIS:

Existen cepas de *Bt* productoras de proteínas tóxicas a *Epilachna varivestis*, las cuales afectan las células epiteliales del intestino medio. A partir de una colección grande de cepas nativas de *Bt* o de insectos muertos pudiéramos encontrar las cepas tóxicas hacia este insecto.

3. OBJETIVOS:

- Establecer métodos para evaluar el efecto tóxico de cepas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).
- Seleccionar cepas de *Bt* patógenas a *E. varivestis*.

4. METAS:

- Realizar bioensayos con toxinas Cry1, Cry2, Cry3, Cry 4 y toxinas raras contra *E. varivestis*.
- Aislamiento de cepas de *Bt* a partir de cadáveres de insectos
- Purificación de las toxinas con actividad hacia esta plaga y caracterización bioquímica de las mismas. Clonación de los genes de interés para su expresión en bacterias acristalíferas.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Cría de *E. varivestis*.

El pie de cría se inició de huevecillos y adultos colectados en campo, de poblaciones que se encontraron alimentándose de fríjol silvestre. Tanto las larvas como los adultos se alimentaron de plantas de fríjol variedad “Jamapa”. Las plantas de fríjol (*Phaseolus vulgaris*) se cultivaron en invernadero sobre charolas germinadoras, usando como sustrato Peat moss y vermiculita en una proporción de 1:1, se regaron dos veces por semana y una fertilización foliar cada 8 días empleando 2 ml/litro de agua, (Bayfolan, Bayer: Nitrógeno 11.47%; Fósforo 8:00%; Potasio 6%; Boro 0.036%; Cobre 0.040%; Fierro 0:050; Molibdeno 0.005%; Zínc 0.080%). Cuando alcanzaron un tamaño de 20 cm o más se infestaron con larvas o adultos de la “Conchuela del fríjol”, los que al terminarse el follaje se pasaron a charolas con plantas nuevas para que siguieran alimentándose.

Las larvas, adultos y las charolas se colocaron dentro de una jaula, cubierta con malla antiáfidos, de un tamaño de 50x50x50 cm para evitar la fuga de los adultos. La cría de *E. varivestis* se mantuvo en un invernadero, a una temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$, Humedad Relativa de $\sim 60\%$ y en los meses de octubre a febrero con 24 h luz para evitar que los adultos entraran al estado de dormancia. Las hembras ovipositan en el envés de las hojas, se colectaron los huevecillos cada 24 horas y se pusieron en cajas de Petri donde eclosionaron, con un algodón húmedo para evitar la deshidratación de los mismos. Las larvas neonatas se pasaron a las plantas para que se alimentaran hasta completar su ciclo para mantener el pie de cría, y el resto se emplearon para realizar bioensayos.

5.2. Origen de las cepas de *B. thuringiensis* evaluadas

Las 144 cepas de *B. thuringiensis* que se evaluaron fueron obtenidas de la colección del Instituto de Biotecnología/UNAM ubicado en Cuernavaca, Mor. Esta colección cuenta con 2000 cepas aisladas de suelos de diferentes partes de la República Mexicana. Estas cepas se caracterizaron por diferentes metodologías: a) geles SDS-PAGE para conocer el número y tamaño de las proteínas Cry; b) por ELISA, usando diferentes anticuerpos policlonales contra toxinas Cry1, Cry2, Cry3 y Cry4 y c) por PCR que permite la identificación de los diferentes grupos de genes *cry* (Ceron *et al.*, 1994; Ceron *et al.*, 1995). Las 144 cepas de *Bt* seleccionadas expresan proteínas activas contra coleópteros (Cry3, Cry7 o Cry8) o proteínas no conocidas porque no cruzaron con ningún anticuerpo o no reaccionaron con ningún oligonucleótido de PCR y por lo tanto podrían representar toxinas completamente nuevas con diferente espectro de acción. La segunda colección de las cepas de *Bt* que utilizamos fueron 97 cepas de la colección de Bayer BioScience, que también producen proteínas Cry no conocidas. También se evaluaron cepas de *Bt* control de cada uno de los grupos descritos (10 tipos diferentes de toxinas Cry1 contra lepidópteros (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F y Cry1H), 5 tipos diferentes de toxinas Cry3 y Cry7 contra coleópteros y 4 tipos diferentes de toxinas Cry4 contra dípteros). También se probaron cepas de una colección de Bélgica (Apéndice VII) y cuatro cepas nuevas que fueron aisladas de cadáveres de insectos (*Epilachna*, 3 2°, 6 1° y 8 1°).

5.2.1. Producción de esporas-cristales de las cepas de *B. thuringiensis* evaluadas

Las cepas se crecieron en medio SP sólido, una caja de Petri por cepa, hasta esporulación y la producción de cristales se observó por medio de microscopio óptico utilizando el ocular 100X. Las esporas y cristales de cada cepa se recuperó en un mililitro de agua estéril en un tubo Eppendorf de 1.5 ml

y se le agregó 1 µl de PMSF (fenil metanosulfonil fluoruro), posteriormente se cuantificó la proteína total por medio de la técnica de Bradford.

5.2.2. Bioensayos preliminares y su estandarización con larvas neonatas de *E. varivestis*

Los bioensayos preliminares se realizaron para poder seleccionar las cepas patógenas empleando dos dosis de cada cepa; 100 y 1000 ng/cm² de follaje, para lo cual se cortó un cuadrado de hoja de frijol, previamente lavada con agua estéril y secada con papel absorbente, de 4 cm por lado, teniendo una superficie total de follaje de 16 cm². Las esporas y cristales se impregnaron con la ayuda de un pincel, cubriendo toda la superficie sobre el haz y envés del follaje, utilizando un volumen total de 60µl mas 3 µl de adherente comercial por cada ml de la mezcla (Agrex F, Agroenzimas, S. A. de C. V.). Los cuadros de follaje se colocaron en cajas de Petri en cuyo interior se le agregó una capa de agar bacteriológico, cubierta con papel absorbente para evitar el contacto directo de la hoja con el agar.

Las hojas se secaron en una campana de flujo laminar y finalmente se colocaron 5 larvas neonatas con la ayuda de un pincel, se hicieron dos repeticiones por tratamiento. En el caso del control al follaje solo se le impregnó de agua más adherente. Después de 7 días se contabilizó el número de larvas vivas y muertas. Los bioensayos se repitieron al menos tres veces.

5.3. Aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* a partir de cadáveres de larvas de *E. varivestis*

Se colectaron cuatro larvas muertas de *E. varivestis* sobre plantas de frijol asociadas a maíz. Las larvas se colocaron en tubos Eppendorff estériles de 1.5 ml, se les adicionó 500 µl de agua destilada y estéril. Las larvas se maceraron con la ayuda de una punta de plástico estéril y se le dio un choque

térmico a 60°C/60 minutos para eliminar otras bacterias y hongos termosensibles. Se tomó una azada de este sobrenadante y se estrió sobre medio SP sólido en una caja de Petri, para obtener colonias únicas. De las colonias crecidas de cada caja de Petri se tomaron 10 colonias y se sembraron individualmente en medio SP hasta esporulación. Se checó el patrón proteico de cada cepa en gel de SDS-PAGE al 10%. Se seleccionó una cepa de cada muestra y se evaluó contra larvas neonatas de *E. varivestis*, utilizando 100 y 1000 ng/cm² de follaje.

5.4. Postulados de Koch

Los postulados de Koch son los siguientes:

1. El mismo patógeno debe de estar presente en todos los casos de enfermedad.
2. El patógeno debe de ser aislado del huésped enfermo en cultivo puro.
3. El patógeno del cultivo puro es inoculado a un huésped sano y debe de causar la enfermedad.
4. El patógeno debe de ser aislado del animal inoculado y debe de ser igual al organismo inicial (Tortora *et al.*, 1998)

De los bioensayos preliminares de las cuatro cepas aisladas de larvas muertas de *E. varivestis* que mostraron alta toxicidad (100% a una dosis de 100 ng/cm²) se seleccionaron cinco larvas muertas al azar, se lavaron perfectamente con agua estéril, las maceramos por separado en un tubo Eppendorff estéril de 1.5 ml más 300µl de agua estéril, se le dio un choque térmico a 60°C/60 min. Se tomó una azada y se estrió sobre medio SP sólido para obtener colonias únicas, de cada muestra, una colonia se creció de nuevo en SP hasta esporulación. El patrón de proteína total de cada cultivo se verificó

en gel de SDS-PAGE al 10%, para visualizar la proteína. Estos cultivos se utilizaron para repetir los bioensayos preliminares.

5.5. Bioensayos para determinar la CL₅₀ de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas *E. varivestis* usando esporas-cristal y de la cepa seleccionada con cristal puro

Primero se calculó la CL₅₀ para la mezcla de esporas y cristales empleando dosis de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ng/cm² de follaje, utilizando cuatro repeticiones por tratamiento, cinco larvas neonatas por repetición y realizando cada bioensayo al menos tres veces. La toma de datos se realizó a los siete días.

La metodología de bioensayo empleada para calcular la Concentración Letal 50 con cristales fue igual a la utilizada en los preliminares. Sin embargo para poder purificar los cristales se tuvo que desarrollar una nueva técnica, ya que los cristales que producen las cepas activas son muy pequeños por lo que la purificación de cristales por medio de gradientes de sacarosa no funcionó.

Las cepas se crecieron en medio SP sólido durante 48 horas, cada cepa se creció en cuatro cajas de Petri y se recuperaron en 20 ml de agua estéril más PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) a una concentración final de 1mM, en un tubo de plástico estéril de un volumen de 40 ml. Las esporas y cristales se resuspendieron completamente. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos (Beckman J2-HS, rotor JA-20). Los sobrenadantes se recuperaron y la pastilla se resuspendió de nuevo, utilizando el volumen de agua y PMSF mencionados anteriormente, guardando nuevamente los sobrenadantes. Los sobrenadantes se centrifugaron a 19 000 rpm por 30 minutos, en las pastillas obtenidas se encontraban los cristales, cada una se recuperó en un tubo Eppendorff de 1.5 ml en 1 ml de agua destilada estéril y

PMSF a una concentración final de 1 mM. Se cuantificó y se visualizó la proteína en un gel de SDS-PAGE al 10%.

5.6. Bioensayos contra *Manduca sexta*, *Spodoptera frugiperada* y *Aedes aegypti*

Se realizaron bioensayos empleando esporas-cristales de la cepa seleccionada (GP1) contra “El gusano del cuerno” *M. sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), la cual es una plaga de importancia económica de cultivos como jitomate y tabaco, entre otros. Se utilizó una dieta merídica (Apéndice III) con la cual se llenaron 24 pozos con 2 ml de dieta en una placa de poliestireno (Cell Wells, Corning Glass Works, Corning New Cork 14831), con una superficie de 2 cm². Se utilizaron dos dosis: 100 y 1000 ng/cm² en un volumen de 30 µl, el cual es suficiente para impregnar la superficie de un pozo. Para cada dosis se hicieron 4 repeticiones (6 pozos por repetición y una larva por pozo). En el control se utilizó agua estéril, la mortalidad se cuantificó siete días después.

Además, se realizaron bioensayos contra otra especie de lepidóptero, “El gusano cogollero” *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), esta especie es una plaga polífaga, es considerada como una plaga primaria de los cultivos sobre los que se alimenta. Se evaluó la actividad tóxica de esporas-cristales de la cepa seleccionada (GP1) hacia larvas neonatas de esta especie de insecto. Se utilizó una dieta merídica (Apéndice IV) con la cual se llenaron 24 pozos de una caja de poliestireno con 2 ml de dieta (Cell Wells, Corning Glass Works, Corning New Cork 14831) con una superficie de 2 cm² por pozo. Se utilizaron dos dosis: 100 y 1000 ng/cm² en un volumen de 30 µl, el cual es suficiente para impregnar la superficie de un pozo. Para cada dosis se hicieron 4 repeticiones (6 pozos) con 6 larvas neonatas. En el control se utilizó agua estéril, empleando el mismo número de larvas. La toma de datos se realizó a los siete días.

En los bioensayos contra *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) se utilizaron larvas de 4to. estadio, empleando esporas-cristales de la cepa seleccionada. Esta especie es de importancia médica ya que es vector de enfermedades humanas. Las pruebas se realizaron utilizando vasos de plástico transparente de un volumen de 100 ml. Se evaluaron tres dosis: 10, 100 y 1000 ng/ml de agua estéril en un volumen total de 50 ml. El control fue solo agua, 24 horas después se observaron los resultados.

5.7. Corroboración de la especie *B. thuringiensis*

Con la finalidad de confirmar si la cepa GP1 pertenece a la especie *B. thuringiensis* se amplificó el gene 16S del rRNA utilizando los oligonucleótidos diseñados por Aguino de Muro y Priest (1993) (Oligo BSH1 GCG CAA GCT TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAC G y el Oligo BSB2 GCG GAT CCT ACC TTG TTA CGA CTT CAC CCC AG). El producto de PCR se mandó a secuenciar en las instalaciones de secuenciación automática del Instituto de Biotecnología-UNAM. La secuencia obtenida se utilizó para hacer una búsqueda en bases de datos usando BLAST n.

5.8. Caracterización de la cepa GP1

La cepa GP1 se caracterizó por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos generales que amplifican los genes que codifican para diferentes proteínas Cry: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry13*, *cytA*, *cytB* y nematodos.

5.9. Purificación de la proteína solubilizada por medio de cromatografía de intercambio iónico

Para caracterizar la proteína de 100kDa se procedió a crecer la cepa GP1 en medio sólido SP hasta esporulación, en 24 cajas de Petri. La

purificación de los cristales se llevó a cabo utilizando la metodología antes mencionada, solo que en tubos de plástico de una capacidad de 40 ml. En cada tubo se recuperaron las esporas-cristal de cuatro cajas de Petri, en un volumen de 20 ml de agua, más Tritón al 0.01% se agregó un inhibidor de proteasas (PMSF) a una concentración final de 1 mM, para evitar que la proteína se degradara.

Las pastillas del primer sobrenadante se resuspendieron en un volumen de 4 ml de agua + 1ml de Buffer de Carbonatos 0.05M (Stock de Na_2CO_3 y NaHCO_3 de 0.5 M pH 10.5) + 30 μl de Cloruro de Sodio 5 M + 0.02% de β -Mercaptoetanol, las del segundo sobrenadante se solubilizaron igual que las primeras. Las mezclas se incubaron durante 2 horas a una temperatura de 37°C y con una agitación de 250 rpm. El solubilizado se centrifugó a 19 000rpm durante 30 minutos. Los sobrenadantes se recuperaron, se cuantificó el contenido de proteína, generalmente se obtenían 30 mg de proteína solubilizada y se visualizó en gel de SDS-PAGE.

La proteína se purificó por intercambio iónico, los 10 ml en los cuales se encontraba la proteína solubilizada, se utilizaron dos tipos de buffers: A (Buffer de carbonatos 10 mM) y B Buffer de carbonatos más Cloruro de Sodio 1 M), se empleó una columna de HiTrap Q (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden), se recuperó la elusión en fracciones de 5 ml, en tubos de ensaye de 10 ml, de cada muestra se tomaron 30 μl , para correrla en gel SDS-PAGE y ver en cuál tubo se encontraba la proteína de nuestro interés.

5.10. Bioensayos con la proteína solubilizada y purificada por intercambio iónico

La proteína purificada se cuantificó y se hicieron los bioensayos, utilizando la técnica antes mencionada y cantidades de proteína de 100 y 1000 ng/cm^2 de follaje.

5.11. Producción de anticuerpos

Se inmunizó subcutáneamente un conejo blanco de Nueva Zelanda con la proteína purificada por intercambio iónico. Se inyectó el conejo tres veces, en cinco sitios en el dorso del animal, cada 15 días, utilizando 1 mg de proteína. La proteína se mezcló con adyuvante de Freund incompleto. Antes de cada inyección se tomó una muestra de 0.5 ml sangre después de cada inyección se tomaron también muestras de sangre, con la finalidad de observar la producción de anticuerpos. Las muestras se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente y luego se centrifugaron 4 min/5000 rpm. Cinco días después de la tercera inmunización se desangró el conejo. La sangre se dejó una hora a temperatura ambiente, se centrifugó 5 min a 2000 rpm, se recuperó el suero, el volumen total se dividió y guardaron 300 µl de suero en tubos eppendorff de 0.5 ml.

5.12. Western blot

Se hizo una electroforesis cargando 3 µg por pozo en un gel SDS-PAGE al 10%. El gel se marca y se sumerge en el buffer de transferencia durante 15 minutos. La membrana de nitrocelulosa se corta, se marca y se sumerge durante 15 min en buffer de transferencia. La membrana y el gel se montan, utilizando las fibras, papel whatman y los soportes. Se agrega el buffer de transferencia cubriendo completamente el montaje. Se monta la cámara de transferencia y se llena con el buffer de transferencia hasta cubrir el soporte con el gel hacia el lado – y el papel hacia el +. Se deja correr dos horas a 350 mA. Se tiñe la membrana con rojo de Ponceau S 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) pocos segundos para visualizar que la proteína se haya transferido, se quita el exceso de colorante con agua destilada y estéril. Se bloquea con leche descremada al 5% en PBS-Tween 0.05% durante una hora. Se quita el exceso de leche lavando con agua destilada y estéril. La membrana se lava dos veces con 2%

Tween-20 en TBS, durante cinco minutos cada uno. Luego se lava con 0.5% Tween-20 TBS, durante tres minutos cada uno.

Se incuba con el primer anticuerpo 1:15 000 en TBS (anti GP1) durante 1 hora. Se enjuaga con agua miliQ una vez. Lavamos dos veces con 0.05% Tween-20 en TBS, 30 ml, durante tres minutos por lavado. Incubamos con el segundo anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (GAR Sigma, St. Louis, MO) (1:7500) durante una hora. En 30 ml de 0.05% de Tween-20 con TBS. Se enjuaga con agua miliQ y lavamos dos veces durante tres minutos con 0.05% de tween-20 en TBS. Se lavó con TBS durante 5 minutos y finalmente se visualizó con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, Rockford, IL).

5.13. Secuencia del N-terminal

Para la secuencia del N-terminal se utilizó la proteína solubilizada y purificada por intercambio iónico. Se preparó un gel SDS-PAGE (Acrilamida al 8%) y se le puso la mitad de Persulfato de Amonio. La mezcla utilizada para hacer el gel se desgasificó durante 10 minutos. Se dejó 24 horas envuelto en papel húmedo para que polimerizara y se dio una corrida con mezcla lítica 1X antes de cargar la proteína. Se cargaron 100 µg de proteína por pozo. Después se transfirió a una membrana de transferencia de PVDF (Polyvinylidene diflouride) Immobilon-P^{SQ} (Apéndice V), utilizando una cámara semiseca de transferencia (Modelo EBU-4000, C.B.S. Scientific Co.).

La proteína transferida se visualizó agregando sobre la membrana Rojo de Ponceau al 0.5%, el colorante se eliminó lavando la membrana con agua MQ estéril. Se cortó la banda de la membrana que contenía la proteína, la cual se utilizó para realizar la secuencia.

5.13.1. Secuencia del N-terminal de un fragmento interno

La proteína solubilizada y purificada por intercambio iónico se cortó en diferentes fragmentos utilizando tripsina (1:50) a 37°C durante 2 horas, la reacción se paró utilizando PMSF 100 mM. La proteína se transfirió utilizando la técnica antes mencionada y se cortó la banda de la membrana que tenía un fragmento de 50 kDa, el cual se utilizó para hacer la secuencia del N-terminal.

5.14. Diseño de oligonucleótidos para obtener la secuencia completa del gene

De la secuencia del N terminal y del N terminal de un fragmento interno se diseñaron un par de oligonucleótidos GP1X Der y GP1Xrev que amplifican 1536 pb. Estos oligonucleótidos contienen sitios de restricción Xba I en sus extremos 5'. Las reacciones en cadena de la polimerasa fueron realizados con las técnicas estándar (Sanbrook *et al.*, 1989), utilizando la ADN polimerasa *Pfu* (Stratagene, La Joya, Ca. USA). Se purificó ADN total de la cepa nativa GP1 y fue utilizado como templado en todas las reacciones en cadena de la polimerasa. El fragmento de PCR fue digerido con la enzima de restricción *XbaI* (New England BioLabs, Beverly, Ma. USA) y clonado en el vector pBluescrip SK (Stratagene, La Jolla, Ca., USA), previamente digerido con la enzima *XbaI*. El producto de ligación se purificó con mezclas de fenol: cloroformo, precipitado con etanol y electroporado en células TG1 electrocompetentes de *Escherichia coli*.

Las colonias transformadas se crecieron en cajas de Petri con LB (Apéndice VI) mas agar y ampicilina (100 µg/ml) y las colonias seleccionadas se guardaron en glicerol al 20% a -70°C. El plásmido se le denominó GP1-SL1. El inserto de DNA fue secuenciado en Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología/UNAM. El análisis BLASTn de la secuencia identificó dos secuencias similares de genes S-layer (GenBank números de accesos

U38842 y X99724). En el alineamiento de estas secuencias se observa que tienen terminaciones 5' y 3' iguales. Por lo tanto se diseñaron dos pares de oligos utilizando las terminaciones 5' y 3' de estos dos genes S-layer y de la secuencia interna del fragmento amplificado. Los oligos BSLX-1 y BSLX-4 amplifican 553 pb en la terminación 5' y los oligos BSLX-3 y BSLX-2 amplifican un fragmento de 1 372 pb en la terminación 3'. Estos dos fragmentos se procesaron igual al anterior para obtener clonas en pBluescript. Posteriormente se purificaron estos plásmidos y se enviaron a secuenciar en las instalaciones del Instituto de Biotecnología/UNAM. De esta manera se obtuvo la secuencia completa del gene que codifica la proteína S-layer.

5.15. Diseño de oligonucleótidos para clonar el gene

El gene que codifica la proteína S-layer no se pudo clonar por la técnica tradicional de clonación. Es decir, utilizando DNA total de GP1, se purificaron fragmentos de 5 000 a 10 000 pb obtenidos de una reacción de restricción Sau 3. Estos fragmentos se limpiaron con mezclas de fenol: cloroformo y se precipitaron con etanol, se clonaron en el Vector Puc19. Con el producto de esta ligación se transformaron células electrocompetentes de *E. coli*, las cuales se crecieron en cajas de Petri con LB y ampicilina. Se seleccionaron las colonias recombinantes, las cuales se utilizaron para hibridizar utilizando el fragmento interno de DNA del gene S-layer de la cepa GP1 amplificado por PCR y marcado con DIG Probe Síntesis Kit (Boehringer Mannheim, no. de catálogo 1636090) en una reacción de PCR, pero ninguna colonia resultó positiva.

También se intentó utilizar los oligonucleótidos BSL-Xba1 y BSL-Xba2 para amplificar el gene completo (3 159 pb), pero tampoco fue exitoso. Se logró la amplificación del tamaño esperado, pero cuando se intento clonar este fragmento en un vector pBluescrip previamente digerido con XbaI, no obtuvimos ninguna cepa recombinante. Posteriormente, mediante revisión de literatura encontramos reportes que indican que los genes S-layer no se pueden clonar

completos con su promotor en células de *Escherichia coli*. El problema es que al expresarse el gene S-layer en *E. coli*, la proteína mata a la célula huésped. Por lo cual se tuvo que desarrollar una estrategia alternativa para poder clonar el gene S-layer.

5.16. Estrategia utilizada para clonar el gene S-layer

Para clonar el gene S-layer se propuso clonar fragmentos contiguos directamente en el vector pHT315 para luego transformar *Bt* sin pasar por *E. coli*. Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos: el producto del primer par incluye el promotor (BSLX-1 y BSLN-5) y amplifica un fragmento de 300 pb. El oligonucleótido BSLX-1 tiene 10 pb extra en la terminación 5', contiene un sitio de restricción *XbaI* y el oligonucleótido BSLN-5 posee un sitio interno de restricción *NcoI* presente en la región Shine-Delgarno anterior al inicio de transcripción. El segundo fragmento se obtuvo con los oligonucleótidos BSLN-6 y BSLN-8 amplifican un fragmento de 800 pb. El oligonucleótido BSLN-6 incluye un sitio de restricción interno de *NcoI* y el oligonucleótido BSLP-8 posee el sitio único de restricción *PstI* del gene S-layer de la cepa GP1. El tercer fragmento se amplificó con los oligonucleótidos BSL-7 y EAGB-4, los cuales amplifican un fragmento de 2.04 kb. El oligonucleótido BSL-7 incluye el sitio único de restricción *PstI* y el oligonucleótido EAGB-4, el cual es similar a BSLX-1 pero tiene 8 pb extra que incluyen el sitio de restricción *Bam HI* en la terminación 5'.

Cada producto de la reacción en cadena de la polimerasa fue purificado y digerido con la enzima de restricción correspondiente y subclonado en el plasmido pBluescript KS. Los fragmentos de ADN de estos plásmidos se purificaron independientemente y se ligaron con el plásmido pHT315, el cual fue digerido previamente con las enzimas *XbaI* y *Bam HI*. El producto de la reacción de ligación se transformó directamente en la cepa acristalífera de *B. thuringiensis* 407, la cual se creció a 30°C en LB con 7.5 µg de Eritromicina. El plasmido resultante se le denominó pHT-GP1. La cepa recombinante se creció

en medio de esporulación sólido, se realizaron bioensayos con esporas y cristales y cristales puros. Además se realizó un western blot utilizando el anticuerpo policlonal dirigido para la proteína de 100 kD de la cepa GP1.

5.17. Interrupción del gene S-layer en la cepa GP1

Se trató de interrumpir el gene S-layer, para que la proteína no se expresara, lo cual se comprobaría con bioensayos y la proteína de 100kDa no se visualizaría en un gel desnaturizante SDS-PAGE, con un casete de resistencia a Kanamicina introducido en el gene de GP1 por medio de una recombinación homóloga. Se amplificaron dos fragmentos utilizando los oligonucleótidos EAG-1 y EAG-2 que amplifican 658 pb y EAG-3 y EAG-4 que amplifican 715 pb. Además se utilizó un casete de Kanamicina de 1500 pb que proviene del vector pDG783 y que contiene el gene *aphA3* de *Enterococcus faecalis*. Este casete se extrae del plásmido mediante una digestión XbaI-EcoRI. Se purificaron todos los fragmentos y se ligaron los tres fragmentos con el vector termosensible PRN5110 Ap^R previamente digerido con la enzima Bam HI y el producto de esta ligación se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* cepa DH5 α . Las células se platearon en medio LB sólido más Kanamicina 10 μ g/ml, de las colonias que crecieron se pusieron a crecer en LB y Ampicilina 100 μ g/ml. Se seleccionó una colonia resistente a ambos antibióticos y se creció en medio LB líquido durante 12 horas, se purificó el plásmido, corroborando la presencia del inserto por medio de una digestión con BamHI y se utilizó este plásmido puro para transformar células de *E. coli* GA-81 Dam⁻, se seleccionaron las que fueron resistente a Kanamicina y Ampicilina.

Se purificó el plásmido de una clona y fue utilizado para transformar células de la cepa GP1, una colonia se creció en LB líquido sin antibiótico a 30° C, se tomó un microlitro del cultivo y se creció durante 24 h en LB más Kanamicina, se diluyó nuevamente el cultivo y se repitió el proceso anterior,

aunque la temperatura fue de 37° C, realizamos diferentes diluciones para obtener colonias únicas. Cien colonias se crecieron a 30° C durante 10 días y cada 24 h se hacían diluciones. De cada cultivo se hicieron diluciones para obtener colonias únicas y se tomaron 100 colonias (en total 10 000), cada colonia se sembró en LB en dos cajas de Petri, una con Kanamicina 200 µg/ml y otra con Eritromicina 100µg/ml. Se buscaban colonias que fueran resistentes a Kanamicina y susceptibles a Eritromicina sin embargo no se tuvo éxito. También se les dio un choque térmico a 40° C y las colonias se procesaron como lo antes mencionado, sólo que se buscó la doble recombinante en 6 300 colonias. Tampoco obtuvimos ninguna colonia doble recombinante.

5.18. Expresión de la proteína S-layer

Con la finalidad de determinar en qué estado de desarrolló de *Bt* se expresa la proteína S-layer en las células de la cepa GP1 se realizó una cinética de crecimiento, para lo cual se creció la cepa en medio SP sólido en cajas de Petri. El crecimiento se inició a partir de esporas, recuperando la mitad de un cultivo de una caja de Petri y se disolvió en 1 ml de agua Mili Q estéril y se le dio un choque térmico a 60°C/60 min para eliminar todas las células vegetativas. Las esporas se estriaron sobre el medio de cultivo cubriendo toda la superficie. Se tomó una azada a las 6, 9, 12, 15 18, 21, 24 y 36 horas, la muestra colectada se guardó en un tubo Eppendorff de 1.5 ml en 300 µl de agua estéril.

De cada muestra se tomaron 3 µl para hacer observaciones en un microscopio compuesto y determinar en qué fase de desarrollo se encontraba la cepa (fase vegetativa o fase de esporulación). Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm/min, el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorff y la pastilla se resuspendió en 300 µl de agua estéril. A cada muestra se le agregaron 30 µl de muestra lítica 4X, se hirvieron durante cuatro minutos y se congelaron. De cada muestra se tomaron 30 µl para cargarlos en un gel SDS-

PAGE al 10% para hacer un Western Blot utilizando un anticuerpo específico contra la proteína GP1.

5.19. Detección de proteína S-layer en otras cepas de *B. thuringiensis*

La proteína se detectó por medio western blot utilizando anticuerpos específicos para la proteína GP1. Las cepas: *B. thuringiensis* subespecie *kurstaki* HD1 y HD 73, *B. thuringiensis* subespecie *israelensis* HD567, *B. thuringiensis* subespecie *aizawai* HD137, *B. thuringiensis* subespecie *tolworthi* HD125 y *B. thuringiensis* subespecie *morrisoni* y *B. thuringiensis* subespecie *tenebrionis* se crecieron hasta esporulación. Se tomó una muestra de cada cepa y se corrió un gel SDS-PAGE, el cual fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Además con el ADN total de estas cepas se realizó una reacción en cadena de la polimerasa utilizando los oligos GP1Xder y GP1Xrev. Para detectar la presencia del gene GP1 en estas cepas.

5.20. Extracción química de la proteína S-layer de la cepa nativa y de la recombinante

Las cepas GP1, *B. thuringiensis* 407 y la recombinante pHT-GP1, se crecieron en 25 ml de medio LB líquido. El crecimiento se inició a una D. O. de 0.05 y las células se recuperaron cuando el cultivo alcanzó una D. O. de 0.9. Se centrifugó el cultivo a 10 000 rpm durante 10 min, el exceso de medio de cultivo fue eliminado, la pastilla de cada cepa se dividió en cuatro tubos eppendorff de 1.5 ml, a dos tubos se le agregaron 500 µl de 2M de cloruro de guanidinio y a los otros dos 500 µl de PBS. Los tubos con PBS fueron los controles. Todos los tubos se incubaron 30 min a -20°C, luego se centrifugaron 10 minutos a 10 000 rpm, y se recuperó tanto la pastilla como el sobrenadante. Las pastillas fueron resuspendidas con 500 µl de PBS. A todas las muestras se les adicionó ácido tricloroacético al 10% para precipitar la proteína, se congelaron durante 20 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas 5 minutos a 10,000

rpm y se descartó el sobrenadante. La pastilla fue lavada dos veces con agua destilada y finalmente fue resuspendida en 0.03N de hidróxido de sodio.

La cuantificación de la concentración de proteína se realizó por el método Bradford (Bradford, 1976). Se tomó una alícuota de la muestra y se llevó a un volúmen final de 800 μ l con agua destilada y se le adicionó 200 μ l del reactivo de Bradford (Protein assay, Bio-Rad) después de mezclar muy bien se midió la absorbencia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman coulter). La curva de referencia se preparó con albúmina sérica bovina (BSA).

5.21. Purificación de la proteína GP1

Se purificó la proteína GP1 por FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) utilizando una columna de intercambio iónico mono Q (Amersham Pharmacia Biotech), La proteína se purificó mediante un gradiente con cloruro de sodio de 0 a 500 mM pH 8.

5.22. Análisis filogenético de la proteína GP1 S-layer y otras proteínas S-layer

Se alinearon las secuencias de aminoácidos de 33 diferentes proteínas S-layer, para realizar un análisis filogenético de estas proteínas. Se estimaron las filogenias a partir de una matriz de distancia que fue obtenida bajo el modelo aditivo, de acuerdo al cual las distancias se espera que sean igual a las sumas de las longitudes de las ramas entre las especies. Las filogenias se estimaron usando el método de Fitch y Margoliash (1967) y el criterio de mínimos cuadrados.

El alineamiento de secuencias de aminoácidos de 33 proteínas S-layer de diferentes bacterias Gram⁺ fue hecho con el programa CLUSTAL W. Con este alineamiento se corrió el programa PROTDIST del paquete de Philyp. La matriz de distancias que resulta del análisis Prodist se utilizó para correr el programa FITCH, el cual nos genera un árbol filogenético de estas 33 secuencias.

Para hacer mas sólido este estudio, se repitió todo este proceso 100 veces utilizando el programa BOOTSTRAP. Este programa re-muestra los datos iniciales para evitar sesgar la información. Al final los 100 árboles que se obtienen se utilizan para obtener un árbol consenso, utilizando el programa COSENSE. Con esta información podemos mostrar un árbol filogenético muy sólido en donde podemos analizar la distribución de cada rama del árbol en los 100 árboles obtenidos y así identificar las ramas que estén presentes en todos los árboles.

6. RESULTADOS

6.1. Cría de *E. varivestis*

Para lograr nuestras metas fue fundamental contar con cantidades suficientes de larvas neonatas de *E. varivestis* y plantas de frijol durante todo el desarrollo de la presente investigación, esto se logró con el establecimiento de la cría en un invernadero con una temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $\pm 70\%$ y 16 horas de luz controlados automáticamente, así como la calendarización de actividades tales como: siembra de 20 charolas con frijol cada 10 días; cada 30 días poner a crecer 200 larvas para tener 200 adultos de la conchuela del frijol.

6.2. Producción de esporas-cristal de las cepas evaluadas de *B. thuringiensis*

Las 241 cepas de *Bt* que fueron evaluadas en este trabajo se crecieron en medio SP y produjeron cristales, en promedio a las 48h. Los cristales se visualizaron en microscopio compuesto con el objetivo 100X. El tamaño y patrón proteico de cada cepa se analizó en geles SDS-PAGE.

6.3. Bioensayos preliminares y su estandarización con larvas neonatas de *E. varivestis*

Las primeras evaluaciones del complejo espора-cristal de *Bt* se hicieron sobre hojas completas de frijol y diluyendo las dosis en 10 ml de agua más 30 μl de adherente. Cada hoja se sumergía en la suspensión correspondiente, sin embargo no se conocía la cantidad exacta de proteína que se impregnaba en la hoja y la superficie de la misma. Se determinó que con una superficie de 16 cm^2 de follaje eran suficientes para realizar los bioensayos y no se necesitaban grandes cantidades de proteína de cada cepa. Además se calculó que con un volumen de 60 μl , incluyendo 3 μl de adherente por ml de suspensión, se cubría la superficie total utilizada y

usando un pincel del No. 1 de pelos de camello se logró distribuir uniformemente el complejo espora-cristal o cristales puros sobre la superficie de la hoja.

En un principio las hojas se colocaban en una caja de Petri conteniendo papel filtro húmedo, sin embargo, las hojas en menos de 24h se deshidrataban y las larvas ya no se alimentaron. Se optó por poner una capa de agar en el fondo de la caja de Petri y se utilizó un volumen de 20 ml/caja más un pedazo de papel absorbente para evitar el contacto directo de la hoja con el agar, así como la acumulación de humedad sobre la tapa de la caja de Petri. Este sistema funcionó perfectamente ya que se logró mantener las hojas verdes hasta por más de siete días.

6.4. Bioensayos preliminares de las cepas de *B. thuringiensis* de las diferentes colecciones

Las cepas de *Bt* que expresan toxinas conocidas que son activas contra especies de coleópteros (Cry3a, Cry3Bb, Cry3Ca, Cry7Aa y Cry8) fueron evaluadas contra larvas neonatas de *E. varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Ninguna de estas toxinas Cry presentó actividad insecticida contra esta plaga. Se evaluó entonces la actividad insecticida de 144 cepas de colección del IBT/UNAM y 97 de la compañía Bayer BioSciences (Apéndice VII), se seleccionaron ocho de las cuales solo cinco causaron mortalidad mayor al 50%, aunque ninguna al 100% con la dosis de 1000 ng/cm² (Tabla 1). Tres pertenecen a la colección del IBT/UNAM y dos a la de Bayer Bioscience. Cada cepa fue caracterizada por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando oligonucleótidos generales y luego con oligonucleótidos específicos para identificar el tipo de genes *cry* que se encuentran presentes en estas cepas. Los resultados obtenidos de estas reacciones nos indican que las cepas IB 206, IB 281, IB 293 e IB 476 tienen genes que codifican proteínas que son activas a coleópteros; la IB 312 e IB 477 no amplificaron con los oligonucleótidos utilizados lo que sugiere que tienen genes nuevos que codifican proteínas que no han sido reportadas y

las cepas 2134N y 306 B tienen genes *cry1*, los cuales expresan proteínas que son tóxicas a larvas de lepidópteros (Tabla 1). Desde el punto de vista comercial no es viable la mortalidad producida por estas cepas, ya que se requerirían grandes cantidades de la proteína para lograr el control de las larvas de la “Conchuela del frijol” en campo.

Tabla 1. Cepas de *Bacillus thuringiensis* de las colecciones de *Bt* que mostraron actividad contra larvas de *Epilachna varivestis*.

Cepa	Genes <i>cry</i>	%mortalidad 100ng/cm ²	%mortalidad 1000ng/cm ²
IB 209	<i>cry 8C</i>	12	50
IB 281	<i>cry3B</i>	5	35
IB 293	<i>cry8C</i>	8	40
IB 306	<i>cry1Aa</i>	10	55
IB 312	-	10	60
IB 476	<i>cry3A</i>	30	80
IB 477	-	5	35
2134N	<i>cry1Aa, cry1Ac</i>	10	50

6.5. Aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* a partir de cadáveres de larvas de *E. varivestis*

Posteriormente se decidió buscar insectos muertos en cultivos de frijol asociado a maíz en la localidad de Chamilpa, Cuernavaca, Mor. La búsqueda de larvas muertas se realizó sobre plantas con hojas que presentaran daños causados por la alimentación de las larvas, las cuales se alimentan sobre el envés de la hoja.

Se evaluó la toxicidad de cuatro cepas seleccionadas de 40 que se aislaron de cuatro larvas de *E. varivestis* que se encontraron muertas en

campo. Estas cepas son muy similares ya que todas tienen el mismo patrón de proteínas cuando se analiza en geles de SDS-PAGE (Fig.7).

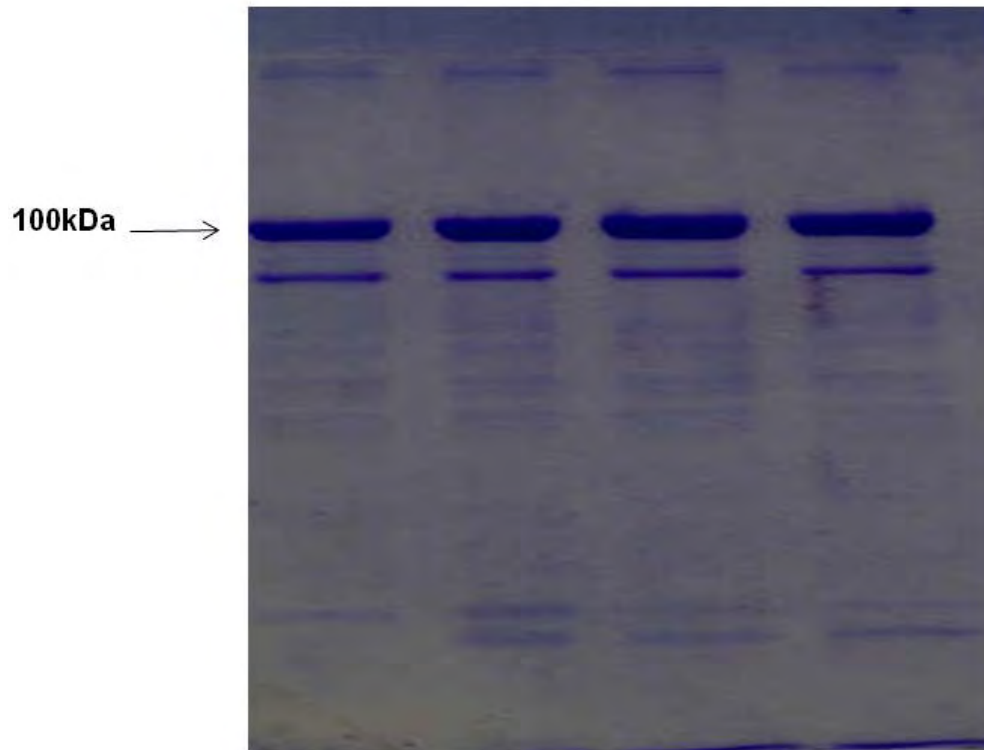


Figura 7. Patrón de proteínas producidos por las cepas aisladas de cadáveres de larvas de *Epilachna varivestis* colectados en campo.

6.6. Postulados de Koch

A las cuatro cepas se les realizó tres veces los postulados de Koch, los cuales se cumplieron, es decir de los cadáveres se aislaron colonias puras de *B. thuringiensis*; las cepas se crecieron hasta esporulación y se evaluaron nuevamente, de los cadáveres de esta evaluación se aislaron nuevamente las cepas puras de *Bt*. De esta forma pudimos comprobar que las cepas de *Bt* eran las que les causaban la muerte a las larvas neonatas de *E. varivestis*.

6.7. Bioensayos para determinar la CL_{50} de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas *E. varivestis* usando esporas-cristal y de la cepa seleccionada con cristal puro

Un cristal pequeño (Fig. 8), compuesto de una proteína de 100 kDa es producido por las cepas (*Epilachna*, 3 2°, 6 1° y 8 1°). Las cuatro cepas produjeron un 100% de mortalidad cuando se evaluaron a dosis 100 y 1000 ng/cm². La CL_{50} fue calculada utilizando esporas-cristal para las cuatro cepas (Apéndice VIII), al menos dos veces se repitieron los bioensayos (Tabla 2). Finalmente se seleccionó una cepa de las cuatro (*Epilachna*) y se le nombró GP1, la cual fue utilizada para realizar los estudios posteriores.

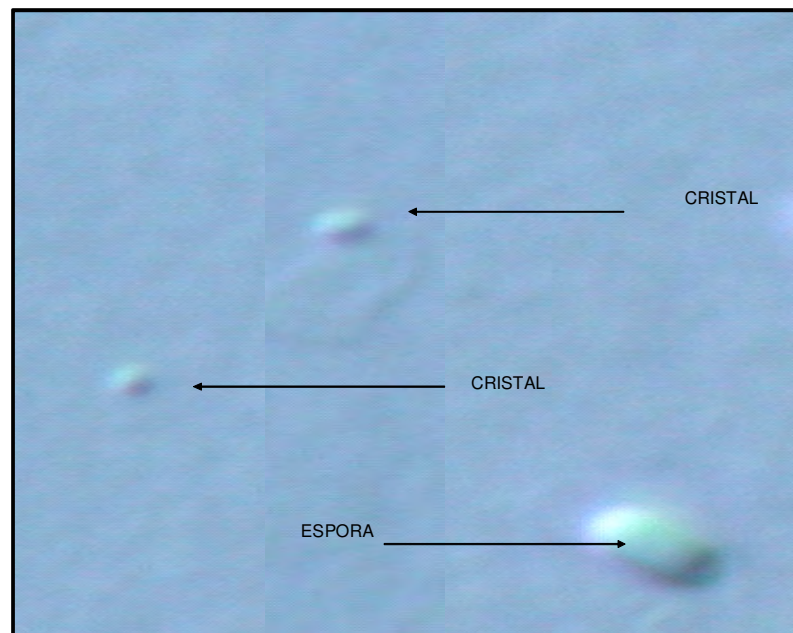


Figura 8. Espora y cristal proteico producido por la cepa GP1, observación en microscopio óptico con objetivo 100X y prisma de Normarski.

El promedio de las CL_{50} para las cuatro cepas sobre larvas neonatas de *E. varivestis* realizados con esporas-cristal fue de 14.1, 9.9, 13.5 y 10.9 ng/cm² de follaje para las cepas *Epilachna*, 6 1°, 3 2° y 8 1°, respectivamente. Se realizaron tres bioensayos con los cristales puros de la

cepa GP1 para calcular la CL₅₀ (Tabla 3), con un promedio de 8.4 ng/cm² de follaje. Lo que confirma que los cristales proteicos son los que tienen la actividad bioinsecticida.

Tabla 2. CL₅₀ de las cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de cadáveres de larvas de *Epilachna varivestis* colectadas en campo.

Cepa	CL ₅₀ ng/cm ² de follaje	Límite inferior	Límite superior
<i>Epilachna</i>	10.4		
	12.6	7.97164	19.17852
	13.4	8.47271	20.49967
	20.3	12.02071	35.20724
3 2°	7.5	4.45655	11.72368
	15.8	9.18579	27.28283
	17.2	10.05401	29.82148
61°	5.6	11.35275	35.48268
	6.4	3.15706	11.78579
	17.9	11.35275	35.48268
8 1°	8.6	4.46074	15.95289
	13.3	7.10751	24.74586

Tabla 3. Concentración Letal 50 empleando cristal puro de la cepa GP1 con larvas neonatas de *Epilachna varivestis*.

Cepa	Concentración Letal 50	Promedio
GP1	4.8	8.4
	10.0	
	10.4	

6.8. Bioensayos contra *M. sexta*, *S. frugiperda* y *Ae. aegypti*

Para determinar si la actividad de la cepa GP1 es específica para *E. varivestis* se probó su toxicidad en bioensayos contra *M. sexta*, *S. frugiperda* y *Ae. aegypti*. La mezcla de esporas-cristal de la cepa GP1 produjo poca mortalidad a larvas de primer estadio de los insectos lepidópteros *M. sexta* y *S. frugiperda*, a dosis de 100 y 1000 ng/cm² de dieta merídica. Las larvas de cuarto estadio del díptero *Ae. aegypti* no fueron afectadas por la proteína a dosis de 10, 100 y 1000 ng/ml de agua. Estos resultados sugieren que esta proteína es específica hacia larvas de *E. varivestis* (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de mortalidad causada por espora-cristal de la cepa GP1 sobre larvas neonatas de *M. sexta*, *S. frugiperda* y *Ae. Aegypti*.

dosis	% de mortalidad		
	<i>M. sexta</i> *	<i>S. frugiperda</i> *	<i>Ae. Aegypti</i> **
0	0.0	8.4	0.0
10	-	-	0.0
100	0.0	12.5	0.0
1000	8.34	20.84	0.0

6.9. Corroboración de la especie *Bacillus thuringiensis*

El gene 16S rARN de la cepa GP1 se amplificó usando los oligonucleótidos reportados por Aguino de Muro y Priest (1993). El producto de PCR que se obtuvo se envió a secuenciar a las instalaciones del Instituto de Biotecnología/UNAM. El análisis de BLAST de la secuencia de ADN del gene 16S confirmó que la cepa GP1 pertenece a la especie *B. thuringiensis*.

6.10 caracterización de la cepa GP1

La cepa GP1 se caracterizó por PCR con oligonucleótidos generales *cry1*, *cy3*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cr11*, *cry13*, *cr14*, y *cytA* (Bravo *et al.*, 1998; Cerón *et al.*, 1994; Cerón *et al.*, 1995). Todas las reacciones de PCR fueron negativas, por lo que se asumió que se trataba de un gene nuevo.

6.11. Purificación de la proteína por intercambio iónico

La inclusión de la cepa GP1 se purificó por centrifugaciones sucesivas, seguida por su solubilización y purificación por cromatografía de intercambio iónico (Figura 9), utilizando una columna Hitrap Q (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). La proteína de 100 kDa eluyó en 250 mM de Cloruro de Sodio.

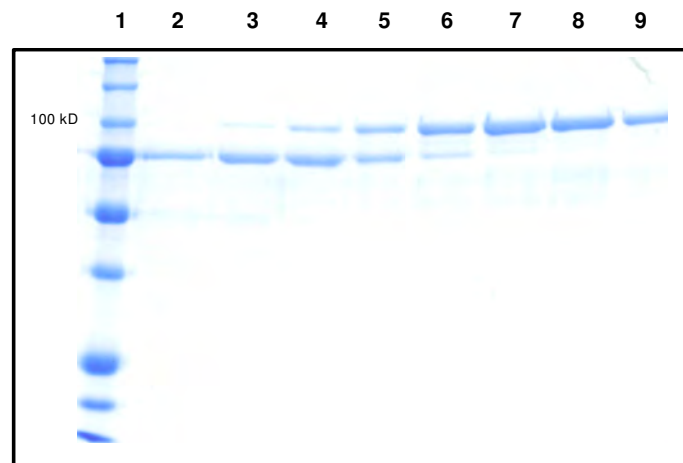


Figura 9. Proteína purificada por intercambio iónico. Carril 1 marcador de peso molecular; Carriles 7, 8 y 9 proteína de 100kDa con actividad a *E. varivestis*.

6.12. Bioensayos con la proteína solubilizada y purificada por intercambio iónico

La proteína pura se dializó con agua y se evaluó a dosis de 100 y 1000 ng/cm² de follaje contra larvas neonatas de *E. varivestis* para comprobar su toxicidad (Tabla 5). Como se puede observar la proteína de 100 kD tiene actividad insecticida a larvas neonatas de *E. varivestis*.

Tabla 5. Porcentaje de mortalidad causada por la proteína producida por la cepa GP1 de *B. thuringiensis* solubilizada y purificada por intercambio iónico a larvas neonatas de *E. varivestis*.

Dosis	Total larvas	% de mortalidad
100 ng/cm ²	20	100
1000 ng/cm ²	20	100
Control (agua)	20	0.0

6.13. Secuencia del N-terminal

Para identificar la proteína de 100 kDa producida por la cepa GP1 se purificó por cromatografía de intercambio iónico y se transfirió a una membrana (Immobilon P^{SQ}) y la secuencia del amino terminal de la proteína se determinó en las instalaciones de Departamento de Microquímica de la Universidad de Harvard (Cambridge, Massachusetts, E.E.U.U.). La secuencia obtenida de aminoácidos (AGKSFPDVPAGH) corresponde a los primeros 12 aminoácidos después del péptido señal de la proteína de superficie de *B. licheniformis* OlpA (u38842) y de *B. anthracis* EA1 (x99724) (Tabla 6), determinada mediante análisis BLAST.

6.14. Secuencia del N-terminal de un fragmento interno

Se realizó una digestión con tripsina de la proteína pura y soluble de 100kDa de la cepa GP1 y se purificó un fragmento de 50 kDa por

cromatografía de intercambio iónico a partir de la cual se obtuvo una secuencia interna de 19 aminoácidos (KLPVTFVTTDQYGDPYGAN), la cual también se encontró en las mismas proteínas de superficie OlpA y EA1 (Tabla 6).

Tabla 6. Localización de las secuencias de fragmentos de GP1 en proteínas homólogas OlpA de *Bacillus lechiniformis* (u38842) y de *Bacillus anthracis* EA1(x99724).

```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment
x99724   MAKTNSYKKVIAGTMTAAMVAGVSPVAAAGKSFDPVPAGHWAEGSINYLVDKGAIITGKP 60
u38842   MAKTNSYKKVIAGTMTAAMVAGVSPVAAAGKSFDPVPAGHWAEDSINYLVDKGAIVGKP 60
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
GP1
x99724   DGTYGPTESIDRASAAVIFTKILNLPVDENAQPSFKDAKNIWSSSKYIAAVEKAGVVKGDG 120
u38842   DGTYGPTESIDRASAAVIFTKILNLPVDENAQPSFKDAKNIWSSSKYIAAVEKAGVVKGDG 120
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
          AGKSFDPVPAGH
x99724   KENFYPEGKIDRASFAFMLVSAYNLKDKNVNGELVTTFEDLLDHWGEEKANILINLGISVG 180
u38842   KDNFYPEGKIDRASFAFMLVGAYNLKEKVDGTLVTKFDDLGRHWGEEKANILVNLGISVG 180
          *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
x99724   TGGKWEPNKSVSRAEAAQFIALTDKKYGKKDNAQAYVTDVKVSEPTKLTLTGTGLDKLSA 240
u38842   TGGKWEPNKSVSRAEAAQFIALTDKKYAKPENSDAKVTNVAATEPTQLTLTGTGLNKLTA 240
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
x99724   DDVTLEGDKAVAIEASTDGTSAVVTLGGKVAPNKDLTVKVKNQSFVTKFVYEVKKLAVEK 300
u38842   EDVTLEGKAIKALEASKDQKSAVVTLVSGIAPNKELPVKVKGNFTIVKYVYEVKKLVEQ 300
          :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
x99724   LTFDDDRAGQAIKFLNDEKGNADVEYLNLANHDVKFVANNLDGSPANIFEGGEATSTTG 360
u38842   LTFDDDRADQAVVFKLNDEKGNADIEYLDIAGHDVKFVANNLDGTPANIFEGGTAESTTG 360
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
x99724   KLAVGIKQGDKVEVQVTKRGGITVSNVTGIITVKNLDTPASAIKNVVFALDADNDGVVNY 420
u38842   KLAVGIAEGKYKVEVQVTKRGGITVSNVTGIIEVKNLDAEATAIKDVVFAVDTKAG-VNY 419
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
x99724   GSKLSGKDFALNSQNLVVGKASLNKLVATIAGEDKVVDPGSIKSSNHGIIISVNNYI 480
u38842   AKPLSGTDFLNSKTLVAGEKAGIHKVVAQINKENKVVDPASISLKSNSPGVIVSKNGEI 479
          ..**.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
x99724   TAEAAAGEATLTIKVGVDVKDFKVTTDSRKLVSVKANPDQLQVQNKTLPVTFVTTDQY 540
u38842   KAEAAGSATLTVKVGVDVTKTFDFVVKTDTRKLTTVKANPDQLKVVDPGKELPVTFVTTDQY 539
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
GP1
x99724   GPPFGANTAAIKEVLPKTVGVAEGLDVTDTSGSIGTKTIGVTGNDVGEGETVHFQN--G 598
u38842   GPPFGANSKAIKEVFPQTGVVAV--LDVTTNEGSIGTSSIKVGENVAGTIHFQNPNA 597
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
GP1
x99724   GDPYGAN
u38842   NGATLGSGLYVNVTEGNVAFKN--FELVSKVGVQYQSPDTKLDLNVSTTVEYQLSKYTSR 656
          SGEYGLSHVEVTKSNIGHEAPRLELVSKAGQKGEAADTTLG--AGNTVAYQLSNYTT 655
          .* ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
x99724   VYSDPENLEGYEVESKNLAVADAKIVGNKVVVTGKTPGKVDIHLTKNGATAGKATVEIVQ 716
u38842   VYADAADLAGYEFVRVGNDKIASAKIEGKTLKVTGKTAGVTDVILTKDGAATGHAITVTQ 715
          **:*. :* ***. . * :*.** ** :. : *****.* :. : *****:*****:*****
x99724   ETIAIKSVNFKPVQTEFVEKINIGTVLELEKSNLDDIVKGINLTKETQHKKVRVVKSGA 776
u38842   ENIQITSVKFKDVEVEQFENRKVNIIDRVLDVVKSDDKDDVNLNGIKLNIISTECHKVRIVDEGT 775
          *.* ***:** ** :. : *****. ** :. : *****:*****:*****:*****
x99724   EQGKLYLDRNGDAVFNAGDVKLGDTVSTSDSALPN-----FKADLYDTL 822
u38842   EQKVYLDNRNDNATFDGNDVALGYVTAVKSNDTVSKEGNDFKFLTDEATNKNKDVFKGV 835
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
x99724   TTKYTDKGLVFKVLKDKDVIITSEIGSQAVHVNVLNPNL 862
u38842   TTAGDKGTVIFKVMKDRVAPTTEYGTAVTINVIKEEI- 874

```

continua Tabla 6

** : ****:***:**. *:* *:** ** :**::..

6.15. Diseño de oligonucleótidos y estrategia para obtener la secuencia completa del gene

Se diseñaron dos oligonucleótidos (GP1der y GP1rev) a partir de las dos secuencias del amino terminal obtenidas de esta proteína. Los oligonucleótidos se utilizaron para amplificar un fragmento interno de 1495 pb que fue secuenciado. El análisis de BLAST de la secuencia resultante mostró un alto porcentaje de similitud (Tabla 7) con la secuencia de los genes *olpA* y *eag* de *B. anthracis* (89 y 60%) que codifican para proteínas de superficie (número de acceso x99724 y AE01119), así como para *B. licheniformis* (72%, número de acceso u38842) y un 65% para una proteína producida por una cepa de *B. thuringiensis* (con un número de acceso AJ249446). La Figura 10 nos muestra la estrategia que se empleó para obtener la secuencia completa del gene S-layer de la cepa GP1.

Tabla 7. Por ciento de identidad de la secuencia de 1495 pb del gene S-layer de la cepa GP1 y otros genes S-layer de otras especies de *Bacillus*.

PROTEINA IDENTIFICADA %IDENTIDAD	ESPECIE DE BACTERIA	
COMPONENTE S-LAYER	<i>Bacillus anthracis</i> X99724	89
PROTEINA S-LAYER	<i>Bacillus licheniformis</i> U38842	72
PROTEINA S-LAYER	<i>Bacillus anthracis</i> AEO11191	60
PROTEINA S-LAYER	<i>Bacillus thuringiensis</i> AJ249446	37

Usando esta información y la secuencia del alineamiento del DNA de estos genes que muestran alta similitud en sus extremos 5' y 3', se diseñaron nuevos oligonucleótidos para amplificar dos fragmentos con un sitio de restricción XbaI que da extremos cohesivos (Tabla 8). Un par amplifica 500 pb adelante del codón ATG para obtener el promotor putativo y

el otro par incluye 200 pb después el codón putativo de terminación TTA (Figura 11). La secuencia completa del gen *gp1* de la proteína de superficie se obtuvo mediante la secuencia de los tres fragmentos sobrelapantes (Gen Bank Acession No. AY956311). El gene está compuesto de 2,589 nucleótidos, antecedida por la secuencia de Shine-Dalgarno (AGGAGG). Se observó una estructura palindrómica de 22 nucleótidos debajo del codón de terminación. La comparación de la secuencia del amino terminal de la proteína y la secuencia de aminoácidos deducida por la secuencia de nucleótidos confirma que la proteína es también sintetizada como un prepolipéptido con un péptido señal de 29 aminoácidos.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para obtener la secuencia completa del gene S-layer de la cepa GP1 de *Bacillus thuringiensis*.

Nombre	Secuencia	POSICIÓN 5'	SITIO DE RESTRICCIÓN
GP1Xder	ACGCTCTAGATAGCAGGTAAATCATTCCCAGACG	411	Xbal
GP1rev	ACGCTCTAGATCGCCGTATTGGTCAGTTGTTAC	1,951	Xbal
BSLX-1	GCTCTAGATGAGAGTGCTTTATAGGAAAAT	-21	Xbal
BSLX-2	GCTCTAGATCCTCGACCTGCGTCACTATCA	3,386	Xbal
BSLX-3	GCTCTAGATACTGCTGAGGCTGCTGGTGAGG	1,766	Xbal
BSLX-4	GCTCTAGATCTTCAGCCGGAGCGTATGTACC	530	Xbal

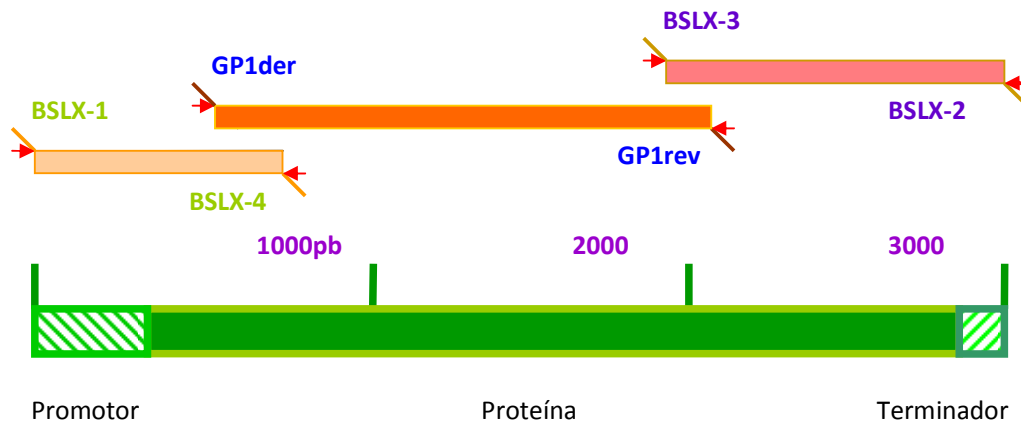


Figura. 10. Estrategia empleada para obtener la secuencia completa del gene que codifica la proteína GP1.

6.16. Detección de proteína S-layer en otras cepas de *B. thuringiensis*

Con la finalidad de determinar si esta proteína también se expresa en otras subespecies de *B. thuringiensis* se realizó un western blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-GP1 preparada previamente como se detallo en Materiales y Métodos para la inmunodetección de la proteína GP1 en otras 9 cepas de *B. thuringiensis* como las subespecies *kurstaki* HD1 y HD73, la subespecie *israelensis* HD567, la subespecie *aizawai* HD137, la subespecie *tolworthi* HD125, la subespecie *morrisoni* y *tenebrionis*, en ninguna de las cuales se detectó (Figura 11). El análisis por PCR de estas cepas utilizando los oligonucleótidos GP1der y GP1rev, confirmó que estas cepas no tienen el gene que expresa la proteína de superficie GP1.

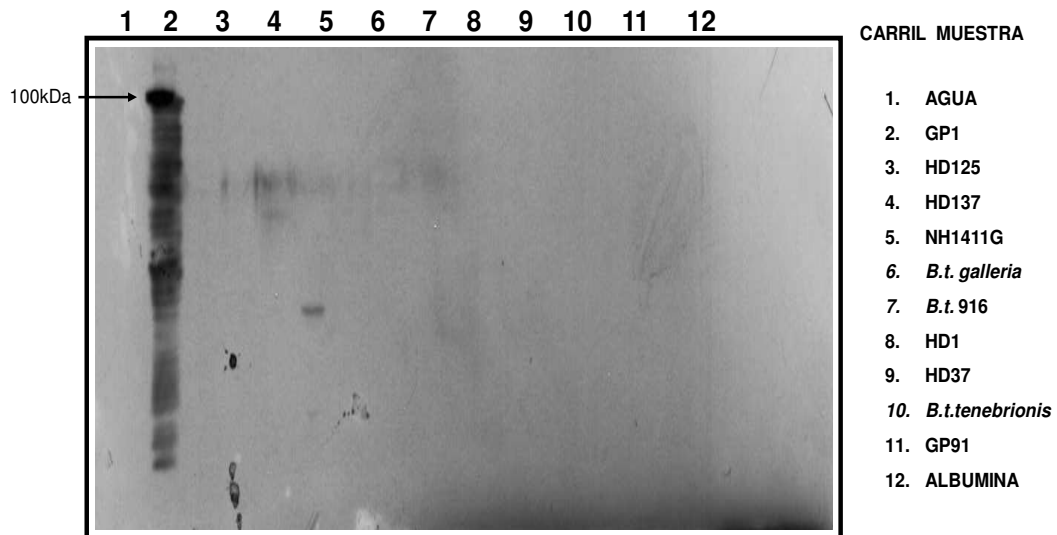


Figura 11. Análisis de la presencia de la proteína S-layer en diferentes subespecies de *B. thuringiensis* y otras cepas de *Bt*, por medio de la técnica de Western blot.

6.17. Mutagenesis por interrupción del gene S-layer con casete de resistencia a kanamicina

Nuestro objetivo con esta técnica fue el de encontrar una cepa doble recombinante que tuviese insertado un casete de kanamicina (km) dentro del gene de GP1 y que no se presentara en el resto del plásmido y por eso buscamos que fuese susceptible a eritromicina (erm) y resistente a kanamicina, ya que km es el antibiótico del casete que interrumpe el gene y Erm es el antibiótico cuya resistencia se codifica en el plásmido. Al transformar la cepa GP1 se obtuvieron ocho colonias resistentes a eritromicina y kanamicina, se tomó una colonia y se le dio un choque térmico a 37°C, se crecieron 100 colonias durante 10 días a 30°C, haciendo diluciones de cada una cada 24 horas. De cada cultivo se tomó una muestra, se plaqueó y se tomaron 100 colonias (total 10 000 colonias) para crecerlas

en LB con eritromicina y kanamicina, algunas perdieron la resistencia a kanamicina.

Se tomó otra colonia y le dimos un choque térmico a 40°C de la cual tomamos 100 colonias; 50 colonias se crecieron durante 10 días a 30°C y cincuenta colonias se crecieron durante 20 días a 30°C. Se plaqueron un total de 6300 colonias de ambos tiempos de crecimiento, el 50% de las colonias perdió la resistencia a ambos antibióticos y el resto a kanamicina, no se encontró ninguna que fuera susceptible a eritromicina y resistente a kanamicina.

6.18. Diseño de oligonucleótidos para clonar el gene

Finalmente, el gene completo *sl-GP1* se clonó directamente en el vector pHT315 y se transformo en la cepa 407 acristalífera de *B. thuringiensis* (Figura 12), amplificando tres fragmentos por PCR con sitios de restricción diferentes respectivamente (Tabla 9). No fue posible obtener células transformantes de *E. coli* con esta construcción, sugiriendo que la proteína de superficie es tóxica a *E. coli* como se había reportado previamente para la proteína Olp de *B. anthracis*, ya que al expresarse la proteína en las células de *E. coli*, las mata (Mensnage *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001).

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para clonar el gene S-layer de la cepa GP1 de *Bacillus thuringiensis*.

Nombre	Secuencia	POSICIÓN 5'	SITIO DE RESTRICCIÓN
BSLX-1	GCTCTAGATGAGAGTGCTTTATAGGAAAAT	-21	XbaI
BSLN-5	TCTTTGCCATGGTATAAATTCCTCCTTC	335	NcoI
BSLN-6	TTATACCATGGCAAAGACTAACTCTTAC	317	NcoI
BSLP-7	AACGCTGCAGTTGTAACACTTGGTGGTAAAG	1,108	PstI
BSLP-8	AAAACCTGCAGAAGTACCGTCAGCACTTGCTTC	1,114	PstI
EAGB-4	CGGGATCCTCCTCGACCTGCGTCACTATCA	3,150	BamHI

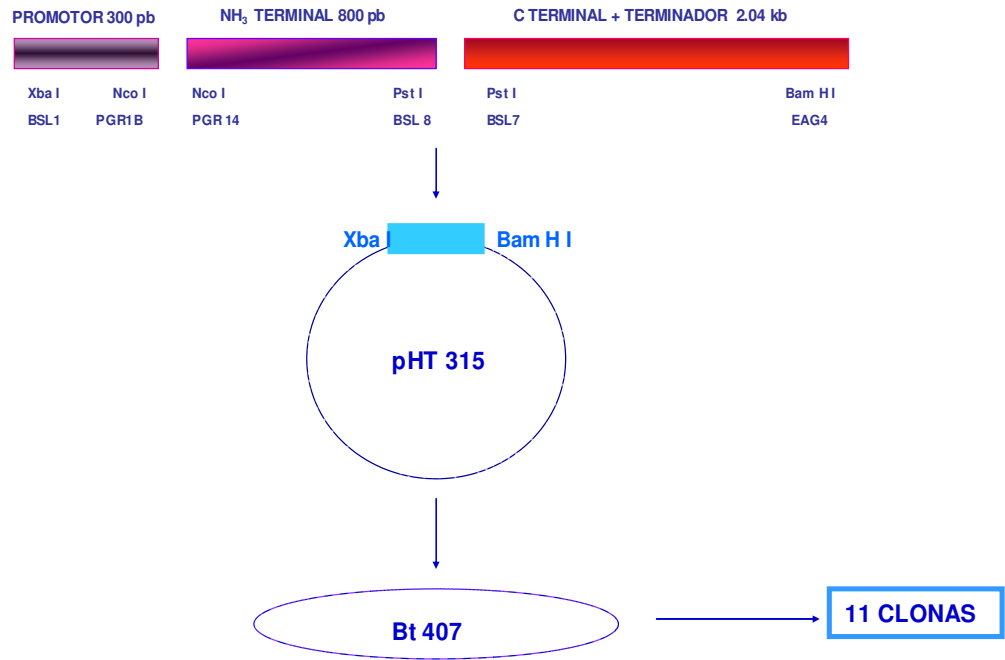


Figura 12. Estrategia utilizada para clonar el gene S-layer de la cepa GP1 en una cepa acristalifera de *B. thuringiensis*.

Sin embargo sí pudimos obtener células transformantes de *Bt*. La cepa resultante de *Bt* expresa la proteína de superficie GP1 en bajas cantidades, como lo muestra la inmunodetección usando anticuerpos policlonales producidos contra la proteína pura GP1 (Figura 13).

6.19. Bioensayos con la proteína recombinante

Se evaluó la toxicidad de un cultivo esporulado de esta clona y produjo un 100% de mortalidad de larvas del primer estadio de *E. varivestis* a una concentración de 1000 ng/cm² en contraste con el control que fue la cepa de *Bt* acristalífera transformada con el vector pHT315 que no expresa la proteína de superficie GP1 y no causó mortalidad a las larvas de *E.*

varivestis. La CL_{50} se determinó utilizando cristal puro utilizando dosis de 0, 5, 10, 15, 20 ng/cm^2 de follaje y fue de 12.65 ng/cm^2 , con un límite inferior de 7.03 y el superior de 19.65.

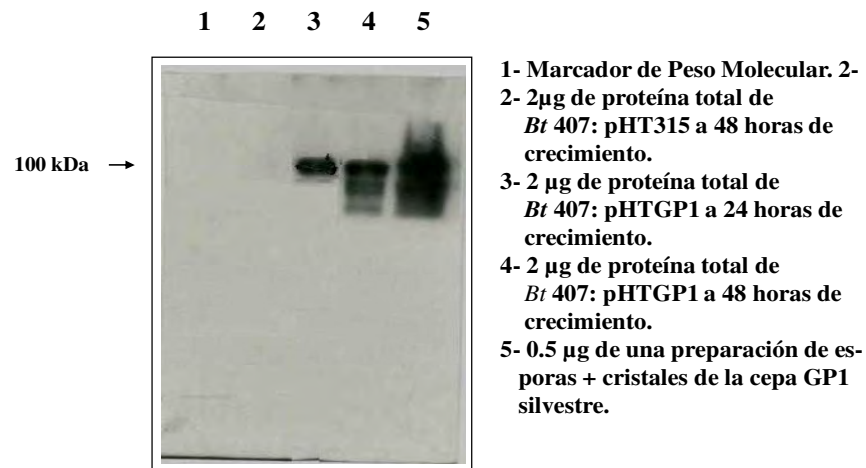
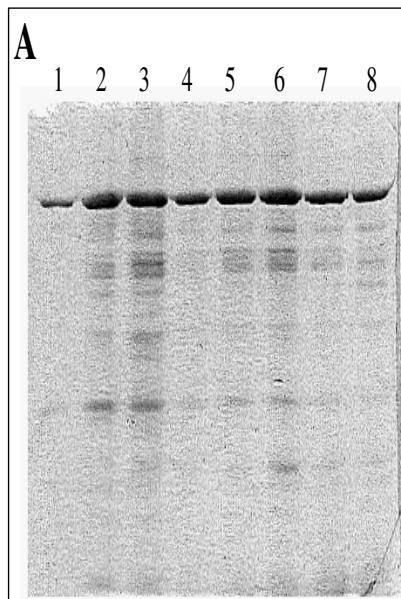


Figura 13. Western blot con el anticuerpo policlonal anti-GP1; 1. Marcador de Peso Molecular; 2. Proteína total *Bt* 407:pHT315; 3. *Bt* 407:pHTGP1; 4. *Bt* 407:pHTGP1 48h; 5. Esporas–cristales GP1.

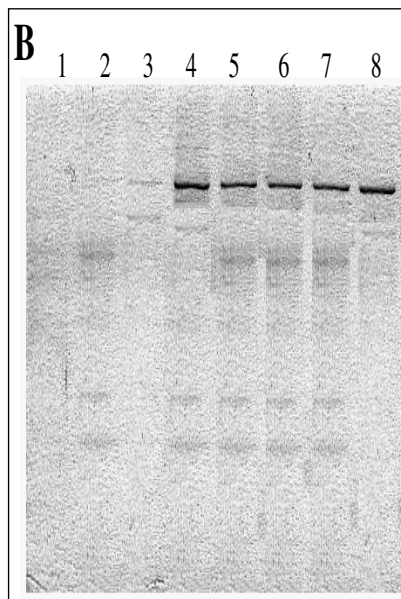
6.20. Expresión de la proteína S-layer

Se analizó el patrón de la expresión de la proteína de superficie GP1 durante el crecimiento de la cepa en medio de esporulación SP. La proteína SI-GP1 es expresada durante la fase vegetativa y también durante la esporulación. Durante la fase vegetativa la proteína está asociada a la bacteria ya que toda la proteína detectada por Western blot se encontró en la pastilla que se obtuvo después de la centrifugación del cultivo. Durante la fase de esporulación la proteína se observa asociada a la bacteria pero también se le encontró en el sobrenadante del cultivo (Figura 14).



A

- 1- CELULAS 6 HORAS
- 2- CELULAS 9 HORAS
- 3- CELULAS + ESPORAS 12 HORAS
- 4- ESPORAS 15 HORAS
- 5- ESPORAS 18 HORAS
- 7- ESPORAS 21 HORAS
- 8- ESPORAS+ CELULAS 24 HORAS



B SOBRENADANTE

- 1- CELULAS 6 HORAS
- 2- CELULAS 9 HORAS
- 3- CELULAS + ESPORAS 12 HORAS
- 4- ESPORAS 15 HORAS
- 5- ESPORAS 18 HORAS
- 7- ESPORAS 21 HORAS
- 8- ESPORAS+ CELULAS 24 HORAS

Figura 14. Expresión de la proteína S-layer durante diferentes fases de desarrollo.

6.21. Purificación química de la proteína S-layer de las cepas nativa y recombinante

Se extrajo químicamente la proteína S-layer de células vegetativas de la cepa nativa (GP1) y de la recombinante (pHT-GP1) (Figura 15) y no se detectó en la cepa acristalífera Bt 407, la presencia de la proteína se determinó por gel SDS-PAGE 10% y Western blot.

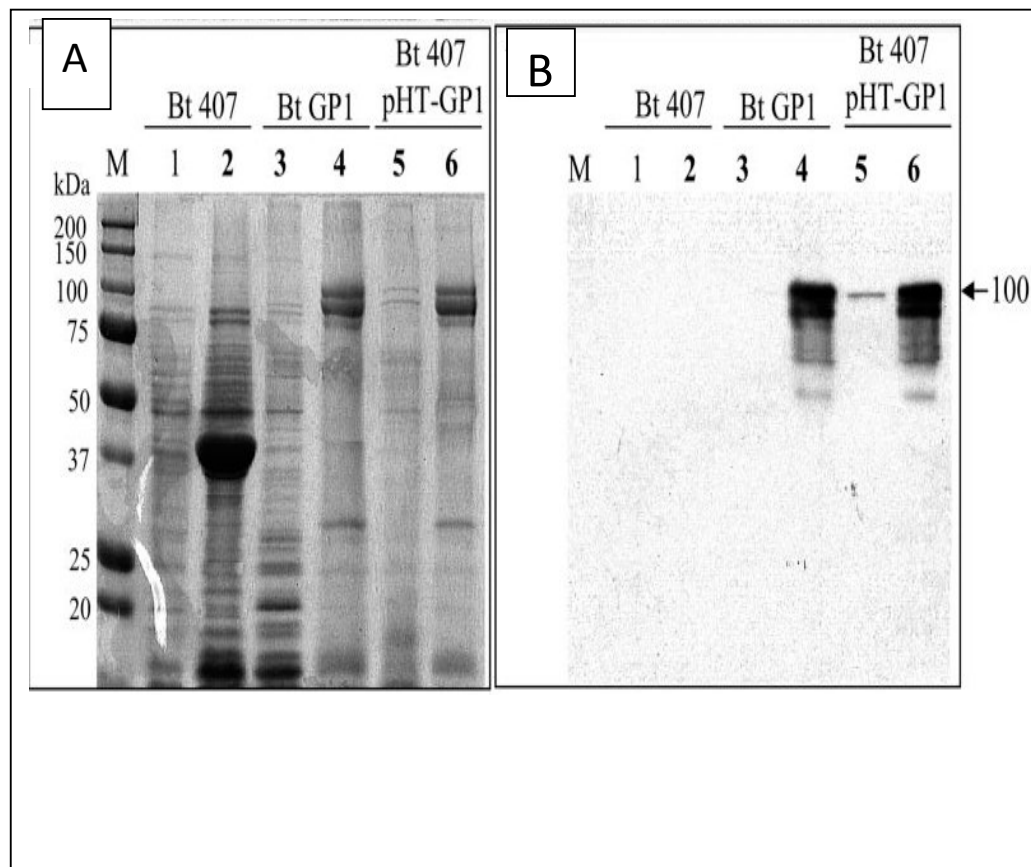


Figura 15. Extracción química de la proteína S-layer. Panel A: M Marcador de peso molecular; carriles 1, 3, 5, visualización de la proteína S-layer en las células de las diferentes cepas después de la extracción química; carriles 2, 4 y 6 proteína S-layer extraída químicamente. Panel B detección de la proteína por Western blot en las diferentes cepas, sobre las células y proteína extraída químicamente.

6.22. Relación filogenética de la proteína de superficie GP1 con otras proteínas de superficie

El alineamiento de aminoácidos de 32 diferentes proteínas de superficie se utilizó para analizar la relación filogenética de estas proteínas (Tabla 10). Se estimaron las filogenias de datos de matriz de la distancia bajo el modelo del árbol aditivo, por lo que de acuerdo con este modelo se espera que las distancias sean igual a las sumas de los largos de las ramas entre las especies usando el método de Fitch y Margoliash (1967) y el criterio de mínimos cuadrados. En este análisis se encircularon algunas ramas que muestran una topología sólida, debido a que fueron encontradas en más del 95% de los árboles obtenidos. Este análisis muestra que las proteínas de superficie es una familia compuesta de grupos de proteínas altamente variables entre los diferentes grupos independientes. Las proteínas de superficie de *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. anthracis*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis* están agrupadas en una misma rama principal (Grupo 1). Las proteínas de superficie de otras bacterias están agrupadas juntas en ramas separadas indicando la relación entre los miembros de cada rama durante su evolución (Figura 16).

La proteína de superficie GP1 está altamente relacionada a la proteína EA1 de *B. anthracis* y a la proteína CTC reportada de *B. thuringiensis* con un 92% de identidad en la secuencia primaria. La proteína de superficie GP1 tiene un 63% de identidad con la proteína OIpA de *B. licheniformis* (U38842). Con relación al resto de las proteínas de superficie encontradas en el grupo *Bacillus*, su relación es bastante baja ya que varía de un 27% a solo 2% de identidad (Tabla 11).

Tabla 10. Proteínas de superficie utilizadas en el análisis filogenético

Base de Genes			
Especie	Gene	No. De aminoácidos	No. De acceso
<i>Bacillus anthracis</i>	sap	814	Z36946
<i>Bacillus anthracis</i>	eag	862	X99724
<i>Bacillus cereus</i>	S-layer like	530	AE017000
<i>Bacillus cereus</i>	S-layer like	486	Eo170006N
<i>Bacillus licheniformis</i>	olpA	874	U38842
<i>Bacillus thuringiensis</i>	SL-GP1	863	AY956311
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	slp	393	X62090
<i>B. thuringiensis galleriae</i>	slpA	821	AJ249446
<i>B. thuringiensis mexicanensis</i>	cryTKD	823	D86346
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ctc	816	AJ012290
<i>Bacillus sphaericus</i>	slaP	1,176	M28361
<i>Bacillus sphaericus</i>	sbpA	1,268	AF211170
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	sbsA	1,228	X71092
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	sbsC	1,099	AF055578
<i>Brevibacillus brevis</i>	mwp	1,053	M19115
<i>Brevibacillus brevis</i>	hwp	1,116	D90050
<i>Campylobacter fetus</i>	sapA2	1,109	S76860
<i>Campylobacter fetus</i>	sapA	933	J05577
<i>Campylobacter fetus</i>	sapA1	920	L15800
<i>Campylobacter fetus</i>	sapB2	1,112	AF048699
<i>Campylobacter fetus</i>	sapB	936	U25133
<i>Clostridium thermocellum</i>	sdbA	631	U49980
<i>Halobacterium</i>	csg	852	J02767
<i>Haloferax volcanii</i>		827	M62816
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	slpA	444	X89375
<i>Lactobacillus helveticus</i>	slpH1	439	X91199
<i>Lactobacillus helveticus</i>	slpH2	439	X92752
<i>Lactobacillus crispatus</i>	cbsA	440	AF001313
<i>Rickettsia prowaseki</i>	spaP	1,612	M37647
<i>Rickettsia rickettsii</i>	p120	1,300	X16353
<i>Rickettsia typhi</i>	slpT	1,645	L04661
<i>Serratia marcescens</i>	slaA	1,004	AB00725

Figura 16. Agrupación de las diferentes proteínas S-layer producidas por las diferentes especies de bacterias

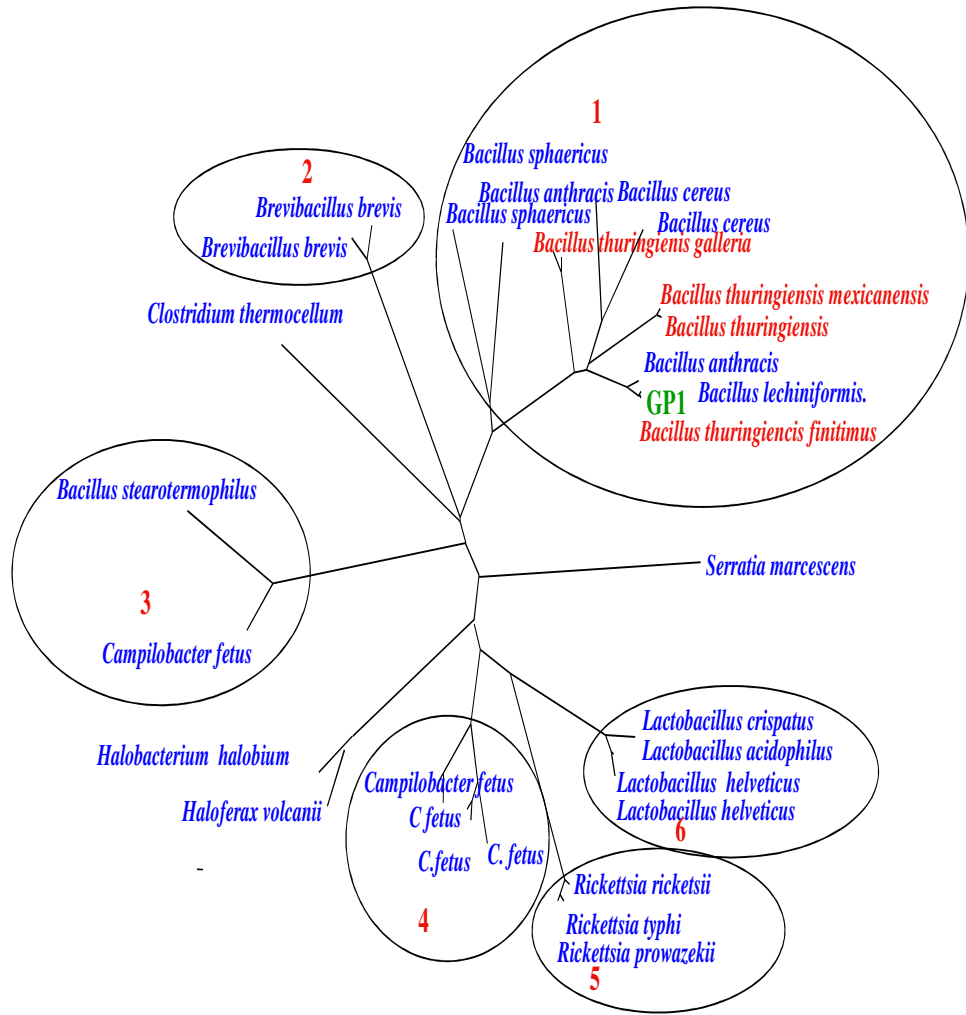


Tabla 12.- Porcentaje de identidad en la secuencia primaria entre las proteínas S-layer.

GenBank AN /species	<i>B. anthracis</i> <i>eag</i>	<i>B.t. finitimus</i> <i>etc2</i>	S-layer GP1 Bt	<i>B. lecheniformis</i> <i>olpA</i>	<i>Bt galleriae</i> <i>slpA</i>	<i>Bt mexicanensis</i> <i>cryTKD</i>	<i>B. anthracis</i> <i>sap</i>	<i>B. thuringiensis</i> etc	<i>B. cereus</i> <i>s-layer</i> like	<i>B. cereus</i> <i>s-layer</i> like	<i>B. sphaericu</i> <i>slaP</i>	<i>B. sphaericus</i> <i>sbpA</i>	<i>Bt israelensis</i> slp
<i>Bacillus anthracis</i> <i>eag</i>	100	96	92	66	26	24	23	23	13	13	7	8	3
<i>Bt finitimus</i> etc2		100	92	65	26	24	23	23	12	13	7	8	3
S-layer GP1 Bt			100	63	27	25	22	23	13	12	8	8	2
<i>B. lecheniformis</i> <i>olpA</i>				100	24	27	24	23	13	12	7	7	2
<i>Bt galleriae</i> slpA					100	73	25	26	15	13	9	7	3
<i>Bt mexicanensis</i> <i>cryTKD</i>						100	25	26	15	13	9	7	3
<i>B. anthracis</i> sap							100	87	13	13	9	7	2
<i>Bt</i> etc								100	14	13	9	7	2
<i>B cereus</i> s-layer like									100	21	4	5	5
<i>B. cereus</i> s-layer like										100	4	3	5
<i>B. sphaericus</i> <i>slaP</i>											100	18	2
<i>B. sphericus</i> <i>sbpA</i>												100	2
<i>Bt israelensis</i> slp													100

7. DISCUSIÓN

La mortalidad producida por las 8 cepas seleccionadas de colecciones de *Bt* por su actividad hacia larvas neonatas de *E. varivestis* fue bastante baja. En el mejor de los casos (cepa IB 476) se observó 80% de mortalidad a una dosis de 1000 ng/cm². Ninguna de éstas podría ser utilizada para desarrollar un producto insecticida ya que desde el punto de vista comercial no es viable, debido a que se requerirían grandes cantidades de la proteína para lograr el control de las larvas de la “Conchuela del frijol”.

Se propuso entonces buscar insectos muertos de *E. varivestis* con la premisa de que sería posible encontrar cepas activas de *Bt* contra este insecto al buscar directamente sobre insectos muertos. Esta hipótesis resultó correcta ya que fuimos capaces de aislar una bacteria con una actividad extremadamente alta y específica contra *E. varivestis*.

De esta manera podemos decir que una conclusión importante de este trabajo es proponer que la búsqueda de bacterias de *Bt* activas para un insecto determinado se haga a partir de cadáveres de insectos de esa especie (Angus y Norris, 1968; Dulmage, 1970; Hansen *et al.*, 1998; Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1976; Pinto *et al.*, 2003) y no de muestras de suelos (Rosas-García *et al.*, 2008; Mastache-Piña, 2009)).

Se aisló y caracterizó la cepa GP1 de *B. thuringiensis* que produce una inclusión compuesta de una proteína de superficie de 100 kDa que es bastante tóxica a larvas de la especie plaga *E. varivestis* del orden Coleoptera. La proteína pura de esta cepa es responsable de la actividad insecticida contra *E. varivestis*, esta actividad parece ser específica ya que esta cepa no es activa a dos especies de lepidópteros y a una especie de díptero. Esta es la primera vez en que una proteína de superficie está implicada en la virulencia hacia un organismo blanco. Guo *et al* (2008) reportan que de 59 cepas de *Bt* aisladas de suelo de diferentes localidades de China que se analizaron por western blot para determinar la presencia de proteínas S-layer, 15 (25.4%) presentaron proteínas S-layer, de las cuales

sólo dos mostraron ligera toxicidad; la cepa B22 produjo un 22.22% de mortalidad a larvas de *Helicoverpa armígera*, a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ y un 3.33% a larvas de tercer estadio de *Aedes albopictus* Skuse, a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ y la cepa I13 causó 77.78% de mortalidad a larvas de *H. armígera* a una dosis 1000 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ y 6.67% a larvas de *A. albopictus* a una dosis de 100 $\mu\text{g/ml}^{-1}$.

La función de las proteínas de superficie es controvertida. Se propone que estas proteínas sirvan de protección a la bacteria ya que la cubren por completo en su exterior y son la barrera con el medio ambiente. También se propone que están involucradas en transporte al interior y también existen reportes en donde se propone que están involucradas en la virulencia de diferentes especies de bacterias como en *Aeromonas salmonidica*, *Campylobacter fetus*, *B. cereus*, *B. anthracis*, y *Rickettsia sp* (Claus *et al.*, 2005).

Esta controversia en cuanto a la función de las proteínas de superficie se debe en gran medida a la gran variabilidad de estas proteínas en su secuencia principal. Prácticamente sólo se parecen en la región SHL que son tres fragmentos repetidos que caracterizan a estas proteínas y el resto de la secuencia es completamente variable en secuencias y tamaños (Claus *et al.*, 2005; Schuster y Sleytr, 2009; Upreti *et al.*, 2003).

Se clonó exitosamente el gen completo *sl-GP1* en una cepa acristalífera de *B. thuringiensis* y se demostró que este gen codifica una proteína que es activa contra larvas neonatas de *E. varivestis*. La región codificadora encontrada en la secuencia contiene 2589 nucleótidos y está antecedita por una secuencia de Shine-Dalgarno (AGGAGG). Se observó una estructura paliandrómica 22 nucleótidos abajo del codón TTA de terminación. La comparación del amino terminal de la secuencia de la proteína y la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos confirma que ésta proteína también es sintetizada como un propolipéptido con un péptido señal de 29 aminoácidos de largo. En esta secuencia tres motivos de dominio homólogos S-layer están presentes; el

primero se observó de los residuos 34 al 76 (FPDVPAGHWGLDSINYLLVDKGAIEGKPDGTYAPAEEDR-ASAA), el segundo de los residuos 95 al 136 (FKDAKNHWASKYIAAVEKA-GVVRGDGKENFSPDKKIDRASFA) y el tercero de la posición 162 a 198 (DHWGEEKKANILIHGLGEGTGGNKWEPNKSVRAEAA).

La baja expresión de la proteína de superficie GP1 en la cepa 407 de *Bt* puede ser debido al sistema complejo de regulación de las proteínas de superficie. Se ha reportado que en *B. anthracis* es dependiente de diferentes factores sigma (Mignot *et al.*, 2002). En esta bacteria existen 2 tipos diferentes de proteínas S-layer (EA1 y Sap). Específicamente en el caso de la expresión de la proteína EA1, la proteína Sap participa para el control temporal de EA1, debido a que Sap actúa como un represor transcripcional del gen *eag* que codifica para EA1. El resultado de esta regulación es que el gen *sap* es expresado durante la fase exponencial, mientras que la expresión de *eag* comienza cuando Sap desaparece que es cuando se entra a la fase estacionaria. La síntesis de EA1 desplaza a Sap de la membrana, por lo que Sap puede ser encontrada en la célula y excretada en el sobrenadante del cultivo, en contraste EA1, sólo se encuentra asociada a las células de la fase de esporulación (Mignot *et al.*, 2002). Es posible que otros factores presentes en la cepa 407 de *Bt* pueda estar afectando la síntesis de la proteína de superficie sl-GP1, se necesitan otros estudios para entender la regulación de la proteína de superficie GP1 en *Bt*. La proteína S-layer de la cepa GP1 se empieza a expresar desde la fase vegetativa, se observó sobre las células vegetativas y en el sobrenadante, incrementándose en el inicio de esporulación.

Las proteínas de superficie comprenden una familia que se localiza en la superficie de especies de bacterias muy diferentes que viven en condiciones ambientales muy diversas y que tienen variados blancos. Estas proteínas están formadas por módulos, consistiendo de dos dominios funcionales.

En este trabajo, se analizó la relación evolutiva de la familia de proteínas de superficie. Debido a que las proteínas de superficie son una de las proteínas celulares más abundantes, se ha propuesto que son productos metabólicos muy costosos y deben dar al organismo alguna ventaja de selección en diferentes hábitats (Beveridge *et al.*, 1997). Los estudios filogenéticos reportados en este trabajo muestran que las proteínas de superficie están agrupadas en un árbol filogenético y sugiere un origen en común. Pero la distribución y gran separación de las diferentes ramas, las cuales agrupan las diferentes bacterias analizadas, puede indicar la separación de estas proteínas que se fueron adaptando y seleccionando para actuar en condiciones particulares de vida. En el caso de *B. thuringiensis*, la actividad insecticida es una ventaja para tener acceso a los nutrientes de la hemolinfa de los insectos blanco.

La proteína de superficie aquí reportada presenta una alta identidad con la proteína EA1 de *B. anthracis* (Mensnage *et al.*, 1998) y a la proteína CTC encontrada en *B. thuringiensis* subespecie *finitimus* (Sun *et al.*, 2001), la cual también tiene un peso molecular de 100 kDa y forma cuerpos parasporales durante la fase de esporulación. Sin embargo no reportan actividad contra alguna especie de insecto, pero esta proteína (CTC) pudiera ser tóxica a algún insecto como lo muestran nuestros datos.

Esta es la primera vez en que se implica directamente a una proteína de superficie en la virulencia hacia un insecto. El único dato que liga directamente a una proteína de superficie de *B. thuringiensis* con virulencia es el reporte que indica que la expresión de los genes de proteína de superficie están controlados por *plcR*. El activador transcripcional PlcR regula la expresión de varios factores extracelulares de virulencia como son enzimas líticas y enterotoxinas (Agaisse, 1999).

Los programas de búsqueda de bacterias de *Bt* han identificado miles de cepas diferentes, las cuales tienen un rango limitado de huéspedes .ya que cada cepa presenta sólo algunos genes *cry* y es activa hacia un número muy limitado de insectos. Pero juntas todas estas bacterias cubren un rango

muy amplio de órdenes de insectos (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallophaga) y aun otros organismos como nemátodos, ácaros y protozoarios.

Las toxinas producidas por *Bt* pertenecen a diferentes grupos de proteínas que no tienen relación alguna filogenética (de Maagd *et al.*, 2003) y que por lo tanto pueden ser divididas al menos en 4 o 5 grupos distintos (Cry de tres dominios, Vip, Cyt, parecidas a Mtx y parecidas a Bin). Algunas de las toxinas producidas por *Bt* muestran similitudes con las toxinas producidas por otras bacterias como es el caso de las proteínas Bin producidas por *B. sphaericus*, las cuales tienen alguna homología con las proteínas Cry 35 y Cry 36 producidas por cepas de *Bt* a las que también se les cataloga como parecidas a Bin. Las proteínas Vip se parecen estructuralmente a toxinas que afectan ADP-ribosilación, como la proteína de difteria que tiene un dominio muy semejante a nivel de estructura con un dominio de Vip. Se propone que Vip pudiera tener esta función, pero aún no se ha encontrado una proteína blanco de esta posible ADP-ribosilación.

Dado que nosotros encontramos que una proteína tipo S-layer es capaz de matar un insecto coleóptero será importante evaluar si otras proteínas de superficie producidas por *Bt* tienen actividad contra otras especies de insectos plaga. Este conocimiento es muy importante para el control futuro de los insectos ya que permitiría tener más herramientas para el control de plagas insectiles. El modo de acción de esta proteína de superficie GP1 no lo conocemos, será importante diseñar experimentos para entender cómo funciona esta proteína, así como su inocuidad hacia otros organismos incluyendo el hombre.

8. CONCLUSIONES

1. Se aislaron cepas de *Bacillus thuringiensis* de cadáveres de larvas de *Epilachna varivestis*, las cuales producen una proteína de 100kDa, la proteína es altamente toxica a larvas neonatas de *E. varivestis*, la proteína producida por la cepa GP1 es una S-layer.
2. Esta es la primera proteína S-layer que se comprueba su actividad toxica hacia un insecto.
3. La proteína GP1 es altamente específica, no es toxica a larvas de otros insectos ya sean lepidópteros o dípteros.
4. La proteína GP1 no se expresa en otras cepas de Bt como *B. thuringiensis kurstaki*, *B. thuringiensis aisawai*, *B. thuringiensis tenebrionis*, *B. thuringiensis israelensis*, *B. thuringiensis morrisoni*.
5. *Epilachna varivestis* no es susceptible a las proteínas Cry3 y Cry7 activas contra coleópteros.

9. PERSPECTIVAS

- 1.- Evaluar la proteína S-layer contra especies de lepidópteros plaga como *Plutella xylostella*, *Phthorimaea operculella*, *Diatraea* spp, *Trichoplusia ni*; coleópteros como *Leptinotarsa decemlineata*, *Diabrotica virgifera virgifera*, *Anthonomus grandis*, entre otros, para determinar si es tóxica a estas especies.
- 2.- Determinar la inocuidad hacia mamíferos (ratones), insectos benéficos como *Apis melífera*, catarinitas depredadoras y plantas (frijol, maíz).
3. Determinar si la proteína es activa contra adultos de *E. varivestis*.
- 4.- Conocer la activación de la proteína, por medio de enzimas como la tripsina o de las presentes en el intestino de *E. varivestis*.
- 5.- Determinar el modo de acción de la proteína S-layer.

APÉNDICE I

Publicación derivada de este proyecto.

A Bacillus thuringiensis S-Layer Protein Involved in Toxicity against
Epilachna varivestis (Coleoptera: Coccinellidae).

Guadalupe Peña, Juan Miranda-Ríos, Gustavo de la Riva, Liliana Pardo-
López, Mario Soberón, and Alejandra Bravo.

Applied and Environmental Microbiology (2006). 72 (1): 353-360

A *Bacillus thuringiensis* S-Layer Protein Involved in Toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)

Guadalupe Peña, Juan Miranda-Rios, Gustavo de la Riva, Liliana Pardo-López,
Mario Soberón, and Alejandra Bravo*

*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),
Ap. Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, México*

Received 4 July 2005/Accepted 6 October 2005

The use of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide is a viable alternative for insect control since the insecticidal Cry proteins produced by these bacteria are highly specific; harmless to humans, vertebrates, and plants; and completely biodegradable. In addition to Cry proteins, *B. thuringiensis* produces a number of extracellular compounds, including S-layer proteins (SLP), that contribute to virulence. The S layer is an ordered structure representing a proteinaceous paracrystalline array which completely covers the surfaces of many pathogenic bacteria. In this work, we report the identification of an S-layer protein by the screening of *B. thuringiensis* strains for activity against the coleopteran pest *Epilachna varivestis* (Mexican bean beetle; Coleoptera: Coccinellidae). We screened two *B. thuringiensis* strain collections containing unidentified Cry proteins and also strains isolated from dead insects. Some of the *B. thuringiensis* strains assayed against *E. varivestis* showed moderate toxicity. However, a *B. thuringiensis* strain (GP1) that was isolated from a dead insect showed a remarkably high insecticidal activity. The parasporal crystal produced by the GP1 strain was purified and shown to have insecticidal activity against *E. varivestis* but not against the lepidopteran *Manduca sexta* or *Spodoptera frugiperda* or against the dipteran *Aedes aegypti*. The gene encoding this protein was cloned and sequenced. It corresponded to an S-layer protein highly similar to previously described SLP in *Bacillus anthracis* (EA1) and *Bacillus licheniformis* (OlpA). The phylogenetic relationships among SLP from different bacteria showed that these proteins from *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *B. anthracis*, *B. licheniformis*, and *B. thuringiensis* are arranged in the same main group, suggesting similar origins. This is the first report that demonstrates that an S-layer protein is directly involved in toxicity to a coleopteran pest.

Chemical insecticides cause many environmental problems. Their exhaustive use has resulted in pollution of soils and underground water. Moreover, a number of synthetic insecticides have lost their efficacy against certain pests due to the development of resistance in these insects. The use of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide is a viable alternative for insect control in agriculture and other areas (i.e., disease vectors) and will intensify crop production in an economically sustainable and environmentally friendly way. The Cry toxins produced by *B. thuringiensis* are highly specific; harmless to humans, vertebrates, and plants; and completely biodegradable, so they cause no residual toxic products to accumulate in the environment (26). To date, over 200 cry gene sequences have been determined and classified into 44 families and different subclasses (7). Additionally, *B. thuringiensis* produces a number of extracellular compounds, such as phospholipases, proteases, and chitinases, and other toxins, such as β -exotoxin and vegetative insecticidal proteins, that may contribute to virulence (26).

The S-layer is an ordered structure of proteinaceous paracrystalline arrays which completely covers the surfaces of many archaea and bacteria (3, 25) and constitutes up to 15% of the total cell protein. The function of S-layer proteins (SLP) has not been accurately defined. It was proposed that these proteins are involved in cell integrity and shape maintenance (3). Also, it has been hypothesized that they may be involved in

macromolecule exchange with the environment since they are the outermost cell envelope component (3). In some gram-negative pathogens, they have been implicated in virulence and resistance to complement-mediated killing (3, 23). In *Bacillus cereus*, the SLP promotes interactions with human leukocytes and with the host, contributing to pathogenicity (14). It has been proposed that in *Bacillus anthracis*, the S-layer and the capsule might cooperate in the interaction with the host (21).

Several S-layer genes have been cloned, and their amino acid sequences have revealed that they have low similarity except in the cell wall-targeting S-layer homology domain, which is involved in the anchoring of these proteins to the peptidoglycan-linked polysaccharides (25). Thus, different types of SLP may have different functions. SLP from *Bacillus* species have a molecular mass of between 66 and 255 kDa. In *B. anthracis*, two different SLP (Sap and EA1) have been described previously (18, 21). The presence of these proteins is not required for normal encapsulation of the bacilli (19). These proteins appear sequentially in a growth phase-dependent manner, with the synthesis of Sap preceding that of EA1 (21). In *B. thuringiensis* subsp. *galleria*, an SLP termed SlpA is similar to the Sap of *B. anthracis*. The construction of a null mutant with a mutation in the corresponding gene revealed that the mutant strain does not express another S-layer gene (20). A parasporal body protein named CTC, described to occur in *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* (GenBank accession number AY460125), shows high identity with the S-layer protein EA1 from *B. anthracis* (27). CTC has a molecular size of 100 kDa and forms a parasporal body during the sporulation phase of

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, UNAM, Ap. Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, México. Phone: (52) 7773 291635. Fax: (52) 7773 172388. E-mail: bravo@ibt.unam.mx.

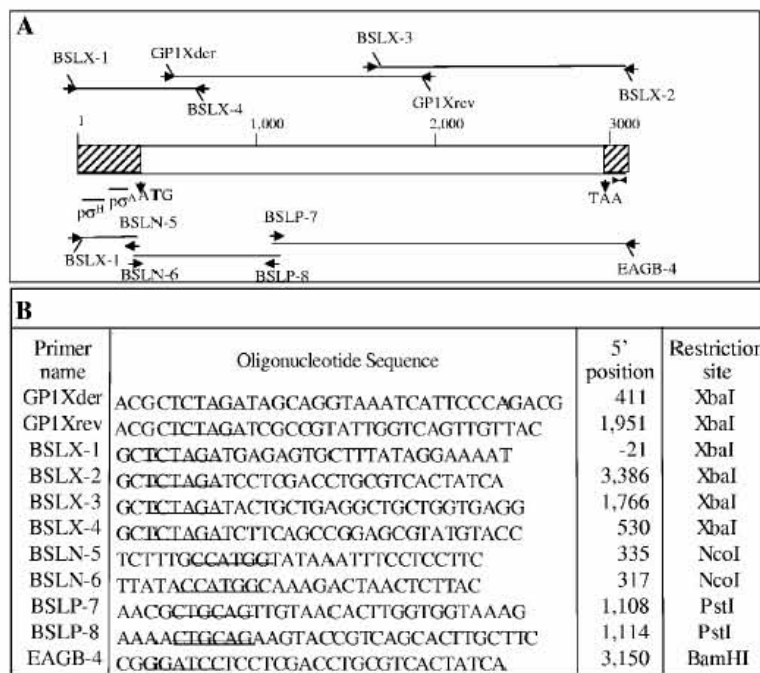


FIG. 1. Diagrammatic representation of S-layer gene fragments and PCR primers. (A) Representation of the S-layer gene of the GP1 strain and locations of oligonucleotides used as PCR primers (arrows); (B) sequences of oligonucleotides used in PCR amplification. Underlined sequences correspond to restriction sites.

growth. So far, the role of SLP of *B. thuringiensis* in virulence against insect pests has never been described.

In this work, we report the screening of *B. thuringiensis* strains for activity against the coleopteran pest *Epilachna varivestis* (Mexican bean beetle; Coleoptera: Coccinellidae). This is a serious pest in various legume crops in North America and in other crops in Asia and Africa, such as cucurbits, solanaceae, beans, maize, sorghum, rice, wheat, cotton, sesame, lettuce, soybean, and cowpea (12). We found that *B. thuringiensis* strains expressing known Cry toxins active against coleopteran species (Cry3A, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca, and Cry7Aa) were not active against this pest. Two *B. thuringiensis* strain collections containing unidentified Cry proteins and *B. thuringiensis* strains isolated from dead insects were used to search for insecticide activity against this pest. One *B. thuringiensis* strain (GP1) was selected, and the parasporal crystal was characterized. Our results show that the GP1 strains produced an SLP that confers toxicity to the *E. varivestis* coleopteran pest.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. *B. thuringiensis* strains that express the different Cry3 or Cry7 toxins were kindly supplied by J. Van Rie, Bayer BioScience N.V., Belgium. *B. thuringiensis* strains from the Mexican collection (4) and from the Plant Genetic System (now Bayer BioScience N.V.) collection were also used in this study. Novel *B. thuringiensis* strains were isolated from dead insect samples by the acetate selection method (28). The *E. varivestis* corpses were washed twice with

sodium hypochlorite 1% and with sterile water before homogenization and *B. thuringiensis* strain isolation.

Bioassays. The bioassays against *E. varivestis* were performed with spore-crystal suspensions or with pure crystal protein using the leaf dip technique. Squares of 4 cm by 4 cm from the *Phaseolus vulgaris* plant leaves were dipped in the toxin diluents and allowed to dry. Different concentrations of each toxin were tested with five larvae at the first instar stage per treated leaf. Four repetitions per concentration were done. Mortality and leaf damage were determined after 6 days. Bioassays against first-instar larvae of *Manduca sexta* or *Spodoptera frugiperda* were done in artificial diet assays as described previously (4). Bioassays against *Aedes aegypti* larvae were done in 100 ml H₂O as described previously (13).

Purification of the crystal inclusion present in the GP1 strain. The GP1 strain was grown in petri dishes containing solid nutrient broth sporulation medium (15). The spore-crystal mixture was collected in 5 ml of sterile water and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. The supernatant was recovered, and the pellet containing only spores was discarded. This step was repeated five times in order to eliminate all spores from the suspension. Finally, the crystal inclusions were recovered by centrifugation at 19,000 rpm for 30 min. The crystal proteins were solubilized in 50 mM Na₂CO₃, pH 10.5, with 0.2% β-mercaptoethanol and purified by anion-exchange chromatography in a Q-Sepharose column, using fast protein liquid chromatography (Pharmacia) (11).

N-terminal sequencing. N-terminal sequencing of the crystal protein produced by the GP1 strain was performed at the Microchemistry Facility of Harvard University (Cambridge, Massachusetts) after separation on 7% sodium dodecyl sulfate (SDS) gels and transfer onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Co., Bedford, MA) in a semidry transfer chamber as directed by the manufacturer. N-terminal sequencing was also carried out from a trypsin fragment of the GP1 crystal protein that was purified by size exclusion high-performance liquid chromatography (11).

Antibody production. A New Zealand White rabbit was immunized with the crystal protein produced by the GP1 strain by subcutaneous injections. One

TABLE 1. S-layer proteins used in the phylogenetic analysis

Species	Gene	No. of amino acids	GenBank accession no.
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>sap</i>	814	Z36946
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>eag</i>	862	X99724
<i>Bacillus cereus</i>	<i>S-layer like</i>	530	AE017000
<i>Bacillus cereus</i>	<i>S-layer like</i>	486	AE017000N
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>olpA</i>	874	U38842
<i>Bacillus thuringiensis</i>	GP1 SL	863	AY956311
<i>B. thuringiensis galleriae</i>	<i>slpA</i>	821	AJ249446
<i>B. thuringiensis finitimus</i>	<i>ctc2</i>	862	AY460125
<i>B. thuringiensis mexicanensis</i>	<i>cryTKD</i>	823	D86346
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>ctc</i>	816	AJ012290
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>slaP</i>	1,176	M28361
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>sbpA</i>	1,268	AF211170
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>sbsA</i>	1,228	X71092
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>sbsB</i>	920	X98095
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>sbsC</i>	1,099	AF055578
<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>mwp</i>	1,053	M19115
<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>hwp</i>	1,116	D90050
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>sapA2</i>	1,109	S76860
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>sapA</i>	933	J05577
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>sapA1</i>	920	L15800
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>sapB2</i>	1,112	AF048699
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>sapB</i>	936	U25133
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>sdbA</i>	631	U49980
<i>Halobacterium halobium</i>	<i>csg</i>	852	J02767
<i>Haloflex volcanii</i>		827	M62816
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>slpA</i>	444	X89375
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>slpH1</i>	439	X91199
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>slpH2</i>	439	X92752
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>cbsA</i>	440	AF001313
<i>Rickettsia prowazekii</i>	<i>spaP</i>	1,612	M37647
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>p120</i>	1,300	X16353
<i>Rickettsia typhi</i>	<i>slpT</i>	1,645	L04661
<i>Serratia marcescens</i>	<i>slaA</i>	1,004	AB007125

milligram of GP1 SLP in phosphate-buffered saline was emulsified with Freund's complete adjuvant and injected at five sites on the back of the rabbit. The rabbit was boosted three times at 15-day intervals with 1 mg of the GP1 SLP mixed with incomplete Freund's adjuvant. A sample of the blood was collected 40 days after the primary immunization.

Determination of the DNA sequence of the SLP gene produced by the GP1 strain. Based on the N-terminal sequencing of the crystal protein and of an internal tryptic fragment of the crystal protein, two PCR primers, GP1Xder and GP1Xrev, that amplify a 1,536-bp PCR product were designed (Fig. 1). PCRs were performed by standard techniques (24) with *Pfu* DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA). Total DNA was extracted from the GP1 strain (22) and used as a template in all PCRs. The PCR product was sequenced in the in-house automated sequencing facilities of the Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, México). BLAST analysis of the sequence identified two related sequences of S-layer genes (GenBank accession numbers U38842 and X99724). Alignment of these sequences demonstrated that they had similar 5' and 3' ends. Four PCR primers were designed from the 5'- and 3'-terminal ends of these S-layer genes and from the internal sequence of the GP1-amplified fragment. Primers BSLX-1 and BSLX-4 amplified a 553-bp 5'-end fragment, and primers BSLX-3 and BSLX-2 amplified a 1,372-bp 3'-end fragment (Fig. 1). Each PCR fragment was digested with XbaI (New England BioLabs, Beverly, MA) and cloned into pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, CA) previously digested with the XbaI restriction enzyme. The ligation products were purified by extraction with phenol-chloroform, precipitated with ethanol, and electroporated into electrocompetent *Escherichia coli* TG1 cells (16). Transformant colonies were grown on LB agar plates and supplemented with ampicillin (100 µg/ml), and selected colonies were mixed with glycerol (20%) and stored at -70°C. These plasmids were named GP1 SL1, GP1 SL2, and GP1 SL3, and their DNA inserts were sequenced at the in-house automated sequencing facilities of the Instituto de Biotecnología, UNAM.

Cloning and expression of GP1 SLP in *B. thuringiensis*. The complete putative S-layer gene was reconstituted by cloning three PCR fragments into the pHT315

plasmid (16). The first PCR product containing the promoter region was obtained with BSLX-1 and BSLN-5. Primer BSLX-1 has an extra 10 bp at the 5' end containing an XbaI restriction site, and primer BSLN-5 has an internal NcoI restriction site (Fig. 1). The second PCR fragment was obtained with primer BSLN-6, which contains an internal NcoI restriction site, and primer BSLP-8, which includes the unique PstI restriction site of the GP1 SL gene. Finally, the third PCR fragment was amplified with primer BSLP-7, which also includes the unique PstI restriction site, and primer EAGB-4, which is similar to BSLX-2 but has 8 extra bp containing the BamHI restriction site at the 5' end (Fig. 1). Each PCR product was purified and digested with the corresponding restriction enzymes and subcloned separately into pBluescript KS. The DNA fragments obtained from these plasmids were purified, ligated, and inserted into the pHT315 plasmid previously digested with XbaI and BamHI. The product of the ligation reaction was directly transformed in the acrylamidiferous *B. thuringiensis* strain 407 (16), which was kindly provided by Didier Lereclus (Pasteur Institute, France) and was grown at 30°C in LB supplemented with 7.5 µg/ml erythromycin. The resulting plasmid was named pHT-GP1. The *B. thuringiensis* strain containing pHT-GP1 was grown in petri dishes containing solid sporulation medium supplemented with erythromycin. The spore-crystal mixture was collected in 2 ml sterile water and used in Western blot experiments. Detection was done with anti-GP1 SL polyclonal antibody (dilution, 1/10,000; 1 h) and visualized with a goat anti-rabbit antibody coupled with horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) (dilution, 1/7,500; 1 h), followed by SuperSignal chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL) as described by the manufacturers.

Chemical extraction of S-layer protein. The GP1 strain, the *B. thuringiensis* strain containing pHT-GP1, and the acrylamidiferous *B. thuringiensis* strain 407 were grown in brain heart infusion broth medium (Difco) until an optical density at 600 nm of 0.9 was reached in order to have exclusively vegetative cells. Cells were pelleted by centrifugation (10 min at 10,000 rpm). Pellets were washed and resuspended in 1/50 of the initial volume of 1, 1.5, or 2 M guanidinium hydrochloride (pH 2.5), as described by Luckevich and Beveridge (17), to extract specifically the cell surface-anchored proteins. The samples were centrifuged for 10 min at 10,000 rpm, and the pellets containing the bacterial cells and the supernatants containing the extracted proteins were then precipitated by adding trichloroacetic acid to a final concentration of 10% (20 min at -20°C). The precipitated proteins were then centrifuged for 10 min at 10,000 rpm, washed two times with H₂O, and resuspended in 0.03 N NaOH. An equal volume of 2× Laemmli sample loading buffer was added. Samples were boiled for 5 min, and equal amounts of protein were loaded onto two SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels. One gel was stained with Coomassie brilliant blue, and the duplicated gel was electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes for Western blot detection using anti-GP1 SL polyclonal antibody as described above.

Amino acid sequence alignment and phylogenetic analysis. An amino acid sequence alignment of 33 different SLP (Table 1) was done with the ClustalW program. The genetic distances among the sequences were calculated with the PROTDIST program in J. Felsenstein's PHYLIP 3.5 phylogeny inference package with the Dayhoff PAM matrix (9). The program FITCH was then used to estimate phylogenies from the distance matrix data under the additive tree model. The phylogenetic analyses were carried out 100 times by using the bootstrapping tool, which generates multiple data sets, in order to get a strict consensus tree. The consensus phylogenetic trees were computed by the CONSENSE program (9).

TABLE 2. Selected *Bacillus thuringiensis* strains from collections that showed activity against *Epilachnia varivestis* larvae

Strain	<i>cry</i> gene	% Mortality	
		100 ng/cm ² of treated leaf	1,000 ng/cm ² of treated leaf
IB281	<i>cry3B</i>	5	35
IB312		10	60
IB476	<i>cry3A</i>	30	80
IB209	<i>cry8C</i>	12	50
IB293	<i>cry8C</i>	8	40
IB477		5	35
2134N	<i>cry1Aa, cry1Ac</i>	10	50
306B	<i>cry1Aa</i>	10	55

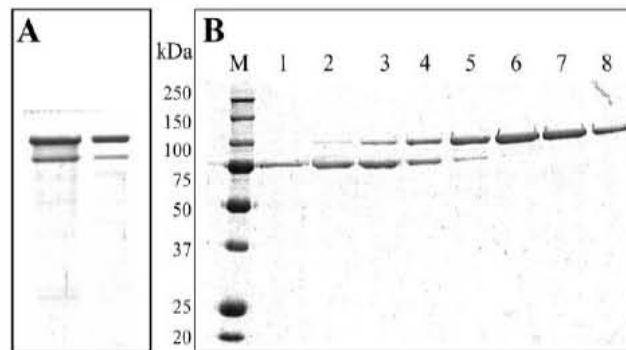


FIG. 2. SDS-PAGE analysis of the fractions from Q-Sepharose chromatography of the crystal inclusion protein of the GP1 strain. (A) Protein profile of the spore-crystal mixture. (B) Elution profiles of anion-exchange chromatography with a linear gradient of 50 to 400 mM NaCl, in 50 mM Na_2CO_3 (pH 10.5), 0.2% β -mercaptoethanol. Lanes 1 to 8, fraction samples subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue; lane M, molecular masses (kDa) of standard marker proteins.

RESULTS

Isolation of *B. thuringiensis* strains active against *Epilachna varivestis*. The toxicity of control *B. thuringiensis* strains containing coleopteran-specific Cry toxins (Cry3s and Cry7Aa) was analyzed. These strains showed no toxicity against *E. varivestis*. We then tested 241 native *B. thuringiensis* strains that are part of two different strain collections, one (144 strains) from Mexico (4) and the other (97 strains) from different parts of the world, supplied by Bayer BioScience. From this screening, only moderately toxic strains were found (Table 2).

Finally, the toxicity of four *B. thuringiensis* strains that were isolated from corpses of *E. varivestis* larvae was assayed. These strains produced similar point crystals composed of a 100-kDa protein and had identical total protein patterns (data not shown). The four strains showed 100% mortality when tested at 100 and 1,000 ng/cm^2 of treated leaf.

One of these four strains was selected and named GP1, and the crystal inclusion was purified by successive centrifugation followed by solubilization and anion-exchange chromatography (Fig. 2). The bioassays against *E. varivestis* larvae performed with spore-crystal mixtures of this strain showed a 50% lethal concentration (LC_{50}) of 16 ng/cm^2 of treated bean plant leaf (95% confidence interval, 7 to 25 ng/cm^2), and the bioassays performed with pure crystal protein presented an LC_{50} of 8.6 ng/cm^2 of treated leaf (95% confidence interval, 4 to 14 ng/cm^2). In contrast, neither the pure crystal nor the spore-crystal mixture of this strain (up to 10,000 ng/cm^2 of artificial diet) showed toxic activity against the first-instar larvae of the lepidopteran insects *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda*, and neither of the 10,000- ng/ml mixtures was toxic against the fourth-instar larvae of the dipteran *Aedes aegypti*.

The GP1 strain was characterized by PCRs using general and specific primers for the *cry1*, *cry3*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry13*, *cry14*, and *cry1A* genes (4, 5, 6). All PCRs were negative (data not shown). The 16S rRNA gene of the GP1 strain was then amplified using the primers designed by Aguino de Muro and Priest (2). BLAST analysis of the 16S DNA

sequence confirmed that the GP1 strain belongs to the *B. thuringiensis* group.

Characterization of the GP1 protein found in the crystal inclusion. The 100-kDa protein produced by the GP1 strain was purified by anion-exchange chromatography and transferred to Immobilon P^{SO}, and the amino-terminal sequence of the protein was obtained. Sequence analysis suggested that the GP1 protein could be an S-layer protein, as the amino-terminal sequence (AGKSFPDVPAGH) corresponded to the first 12 amino acids after the signal peptide of an SLP precursor from *B. licheniformis* OlpA (GenBank accession number U38842) and *B. anthracis* EA1 (X99724). Trypsin digestion of the pure GP1 protein was performed, and a fragment of 50 kDa was purified by size exclusion high-performance liquid chromatography. An internal sequence of 19 amino acids (KLPVTFVTTDQYGDG

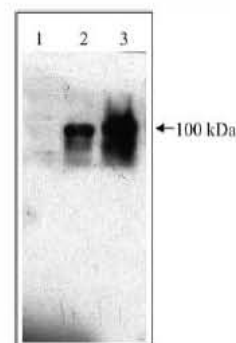


FIG. 3. Western blot analysis of GP1 S-layer protein. Lane 1, control strain, *B. thuringiensis* 407 transformed with pHT315 plasmid; lane 2, *B. thuringiensis* 407 strain transformed with pHT-GP1 plasmid; lane 3, GP1 strain. Samples were subjected to SDS-PAGE, and the GP1 SL protein was detected by Western blotting with an anti-GP1 SL polyclonal antibody.

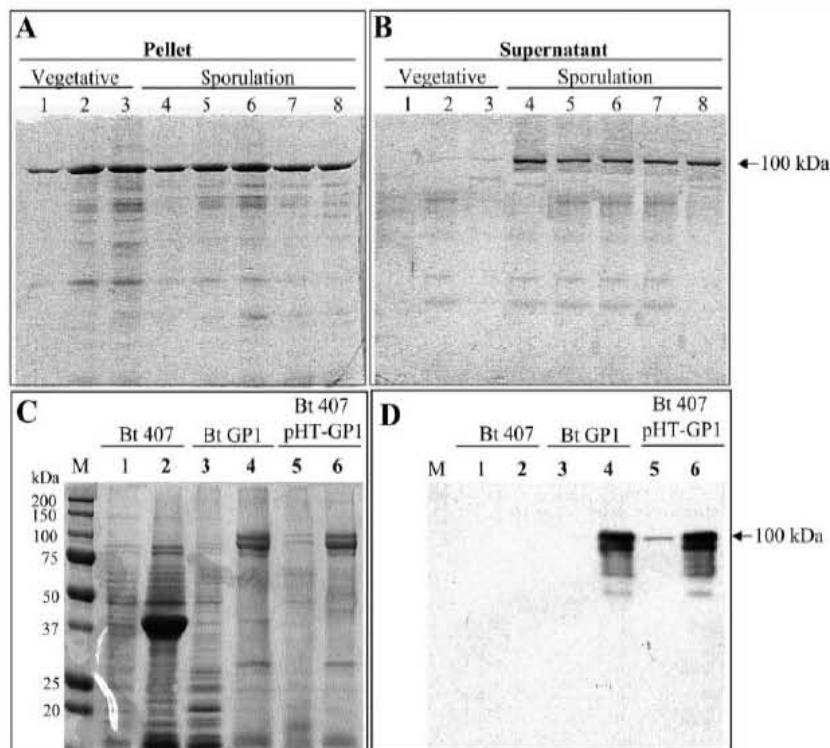


FIG. 4. Expression of the GP1 SL protein in the GP1 strain. (A and B) Analysis of the expression of the GP1 SL protein during growth in SP sporulation medium determined by Western blotting using a specific anti-GP1 SL antibody. (A) Detection of the GP1 SL protein attached to the bacteria in the pellet of centrifuged cultures (10 min at 10,000 rpm). (B) Detection of soluble protein secreted into the supernatant of the same centrifuged cultures. Lane 1, 6 h of growth; lane 2, 9 h of growth; lane 3, 12 h of growth; lane 4, 15 h of growth; lane 5, 18 h of growth; lane 6, 21 h of growth; lane 7, 24 h of growth; lane 8, 36 h of growth. (C and D) Extraction of S-layer proteins from vegetative cells by using 2 M guanidine hydrochloride (pH 2.5). The proteins that remained attached to the cell wall or were released into the supernatant after chemical extraction were analyzed by SDS-PAGE, the gels for which were stained with Coomassie brilliant blue (C), and by Western blot detection using anti-GP1 SL polyclonal antibody (D). The proteins that remained attached to the cell wall are presented in even-numbered lanes, and the proteins extracted from the cells are presented in odd-numbered lanes. Lanes 1 and 2, control strain, *B. thuringiensis* 407; lanes 3 and 4, GP1 strain; lanes 5 and 6, *B. thuringiensis* 407 transformed with pHT-GP1 plasmid containing the GP1 SL gene. Bt, *B. thuringiensis*.

YGAN) that was also found in OlpA and EA1 SLP was obtained.

PCR primers (GP1Xder and GP1Xrev) (Fig. 1) were designed from the N-terminal sequence of the GP1 protein and from the internal tryptic fragment of this protein. These primers were used for the amplification of an internal fragment that was sequenced. BLAST analysis of the resulting sequence showed high scores with sequences of two S-layer genes, *olpA* and *eag*. Using this information and the DNA sequence alignment of these genes, novel PCR primers were designed to amplify two other overlapping PCR products. One included 500 bp upstream of the ATG codon in order to have the putative promoter (Fig. 1), and the other included 200 bp after the putative stop codon (Fig. 1). The sequence of the complete GP1 SL gene was obtained (GenBank accession number AY956311). The open reading frame found in this sequence contained 2,589 nucleotides; it was preceded by a Shine-

Dalgarno sequence (AGGAGG). A palindromic structure was observed 22 nucleotides downstream from the TTA stop codon. Comparison of the N termini of the sequenced protein and of the amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence confirmed that this protein is also synthesized as a prepolyptide with a 29-amino-acid-long signal peptide. Three S-layer homology domain motifs are present in this sequence; the first was observed from residues 34 to 76 (FPDVPAGHWGLD SINYLVDKGAIEGKPDGTYAPAEIIDRASAA), the second from residues 95 to 136 (FKDAKNHWASKYIAAVEKAGV VRGDGKFNFSPPDKKIDRASFA), and the third from positions 162 to 198 (DHWGEEKANILHLGLSEGTGGNK WEPNKSVSRAEAA).

Finally, the complete GP1 SL gene was cloned directly into the *B. thuringiensis* acrySTALLIFEROUS strain 407 by amplifying three PCR fragments that overlap in NcoI and PstI restriction sites (Fig. 1). It was not possible to obtain *E. coli* transformant cells

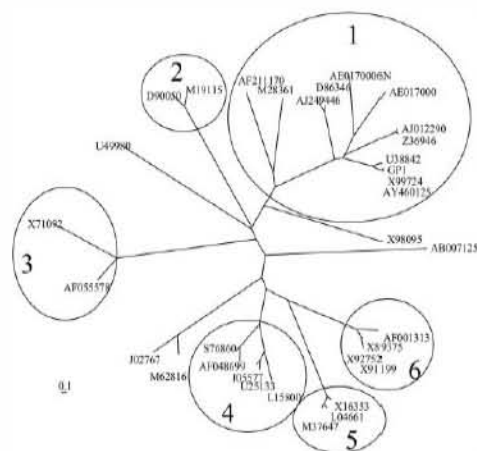


FIG. 5. Unrooted phylogenetic tree of S-layer protein sequences. Encircled branches correspond to branches with solid topology and to different groups of bacteria. Groups: 1, the *Bacillus* sp. group; 2, *Brevibacillus brevis*; 3, *Geobacillus stearothermophilus*; 4, *Campylobacter fetus*; 5, *Rickettsia* sp.; 6, *Lactobacillus* sp. The numbers of the S-layer proteins correspond to their accession numbers in GenBank.

with this construction. Other authors have reported that in many cases, the cloning of the S-layer gene in *E. coli* cells with its regulatory region could lead to problems (20, 27). The resulting *B. thuringiensis* strain expressed the GP1 SL protein, as judged by immunodetection of the protein using a polyclonal antibody raised against the pure GP1 protein (Fig. 3). A sporulated culture of this strain showed 100% mortality of *E. varivestis* larvae when assayed at 100 and 1,000 ng/cm² of treated leaf. This was in contrast to what was found with the control strain transformed with the pHT315 shuttle vector that does not express the GP1 SL protein; it did not show toxicity to *E. varivestis* larvae. The crystal inclusion was purified from the transformant strain 407pHT-GP1, and bioassays against *E. varivestis* larvae showed a lethal concentration (LC₅₀) of 10 ng/cm² of treated leaf (95% confidence interval, 5 to 19 ng/cm²).

Expression of the GP1 SL protein in the GP1 strain. The expression of the GP1 SL protein during growth in SP sporulation medium was then analyzed. Figure 4A and B show that this protein was expressed during the vegetative (lanes 1 to 3) and the sporulation (lanes 4 to 8) phases of growth. During the vegetative phase of growth, the protein was associated with the bacteria since all the protein detected by Western blot analysis was found in the bacterial pellet obtained after the centrifugation of the culture (Fig. 4A, lanes 1 to 3). However, during the sporulation phase, the GP1 SL protein was found associated with the bacteria (Fig. 4A, lanes 4 to 8) and also found in the supernatants of centrifuged cultures (Fig. 4B). Luckevich and Beveridge (17) described a specific extraction procedure for the SLP of *B. thuringiensis* subsp. *galleria*. We used this method with the purpose of testing whether the GP1 SL protein has the ability to bind to the cell surface from the original strain and in the transformant strain as other SLP do. Figure 4C and D show the treatment of vegetative cells with 2 M

chaotropic agent at a low pH, which resulted in the specific extraction of the GP1 SL protein as judged by the SDS-PAGE (Fig. 4C) and Western blot analysis (Fig. 4D) of the extracted protein. The GP1 SL protein was present only in the GP1 strain and in the *B. thuringiensis* 407 transformant strain; this protein was absent in the 407 acrylamidiferous strain that, in contrast, showed a protein of 37 kDa (Fig. 4C). Similarly, as reported by Luckevich and Beveridge (17), the GP1 SL protein was extracted from the vegetative cells only with the treatment of 2 M chaotropic agent; treatments with lower concentrations of the chaotropic agent (1 to 1.5 M) did not extract the protein from the bacterial cells (data not shown).

Western blot detection of the GP1 SL protein was also performed in other *B. thuringiensis* strains, such as *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 and HD73, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HD567, *B. thuringiensis* subsp. *azawai* HD137, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD125, and *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni tenebrionis*. These studies showed that this protein is not produced in these strains (data not shown). PCR analysis of these strains, using primers GP1Xder and GP1Xrev, confirmed that these *B. thuringiensis* strains do not harbor the GP1 SL coding sequence (data not shown).

Phylogenetic relationships of GP1 SL proteins with other S-layer proteins. An amino acid sequence alignment of 33 different SLP was used to analyze the phylogenetic relationship of these proteins. We have estimated the phylogenies from the distance matrix data under the additive tree model, according to which the distances are expected to equal the sums of the branch lengths between the species, by using the Fitch and Margoliash method (10) and the least squares criterion. Figure 5 shows the phylogeny of the SLP sequences. The encircled branches represent branches with a solid topology, since they were found in more than 95% of the obtained trees. This analysis demonstrated that SLP are highly variable in forming independent clusters. The SLP from *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. anthracis*, *B. licheniformis*, and *B. thuringiensis* are arranged in one main group (Fig. 5, group 1). The SLP of other bacterial species are clustered together in separate branches, indicating the relationship among the members of each branch in the evolutionary process.

The GP1 SL protein is highly related to the EA1 protein from *B. anthracis* and to the CTC2 protein reported for *B. thuringiensis* subsp. *finitimus*, with 92% identity at the nucleotide sequence level with both proteins. The GP1 SL protein showed 63% identity with the OlpA protein from *B. licheniformis* (GenBank accession number u38842). In relation to the rest of the SLP found in the *Bacillus* group, the sequence identity is quite low, ranging from 27% to 15% identity.

DISCUSSION

We isolated and characterized *B. thuringiensis* strain GP1, which produces a parasporal crystal composed of a 100-kDa S-layer protein that is highly active against the coleopteran pest *Epilachna varivestis*. The pure crystal protein preparation of this strain is responsible for the insecticidal activity against *E. varivestis*, and this activity appears to be specific since this strain is not toxic to the larvae of the two lepidopteran species and the one dipteran species examined here. It was shown for the first time that an SLP is directly implicated in virulence

against the target organism. The complete GP1 SL gene from a *B. thuringiensis* strain was successfully cloned, and it was demonstrated that this gene encodes a protein active against this pest.

The GP1 SL protein of the GP1 strain shows 92% identity at the primary sequence level with the EA1 protein of *B. anthracis*. In *B. anthracis*, the expression of SLP is dependent on different sigma factors (21). In addition, in the case of the EA1 protein, the regulatory system is quite complex, since the Sap protein (the other SLP) is required for the temporal control of EA1, as it acts as a transcriptional repressor of the *eag* gene. The result of this regulation is that the *sap* gene is expressed during the exponential phase, whereas *eag* expression starts in the stationary phase. The synthesis of EA1 displaces Sap from the rigid cell wall layer; thus, Sap could be found both cell associated and secreted into the culture medium. EA1, in contrast, is associated only with the sporulated cells (21). In the case of the GP1 SL protein of the GP1 strain, this protein is associated with the bacteria during both growth phases but is also found in the medium of sporulated cultures. Further studies are needed to understand the regulation of the GP1 SL protein in *B. thuringiensis*.

The SLP comprise a family of proteins found on the surfaces of very different bacterial species that live under different environmental conditions and have different targets. These proteins are modular in structure, consisting of two different functional domains. In this work, the evolutionary relationship of the SLP family was analyzed. Since SLP represents an abundant cellular protein group, it has been proposed that these metabolically expensive products must provide organisms with some advantage of selection in different habitats (3). The phylogenetic studies reported here showed that SLP distribute in different branches that group the different bacteria analyzed. These data support the divergence of these proteins, which were adapted and selected for acting under particular living conditions. In the case of *B. thuringiensis*, the insecticidal activity is an advantage in gaining access to the nutrients of the hemocoel in a sensitive insect. The phylogenetic study showed that the SLP described here is highly related to the EA1 protein from *B. anthracis* (19) and also to the CTC protein found in *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* (27), which has a molecular size of 100 kDa and forms a parasporal body during the sporulation phase of growth. However, this is the first time that a putative SLP has been directly implicated in the virulence of *B. thuringiensis* strains against their targets. The only evidence that links SLP of *B. thuringiensis* with virulence is the report that the expression of S-layer genes is controlled by *plcR*. *PlcR* is a transcriptional activator of several extracellular virulence factor genes, such as degradative enzymes and enterotoxins (1).

Screening programs have identified thousands of different *B. thuringiensis* strains, all of which have a limited host range but together span a wide range of insect orders (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, and Mallophaga) and even other organisms, such as nematodes, mites, and protozoans. The toxins produced by *B. thuringiensis* belong to different protein groups (8) that could be divided into at least four or five fundamentally distinct homology groups (three Cry domain toxins, Vip, Cyt, Mtx-like, and Bin-like). Some of the toxins produced by *B. thuringiensis* share

similarities to toxins produced by other bacteria, as in the case of the binary toxins produced by *B. sphaericus*, which have some homology with the Cry35 and Cry36 proteins produced by *B. thuringiensis* strains. This work will add a new protein to the list of insecticidal proteins produced by *B. thuringiensis*. This work also showed that classical screening strategies using *B. thuringiensis* strains isolated from soil samples could be laborious and inefficient at isolating strains highly active against a selected pest. The strategy for isolating *B. thuringiensis* strains from dead insect bodies seems to be highly effective at identifying active strains.

Finally, it would be relevant to test whether other S-layer proteins produced by *B. thuringiensis* have some insecticidal activity against other insect species. This knowledge could be important for future control of insects. However, the mechanism of action of this SLP is unknown, and future work is needed to describe it.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Lizbeth Cabrera, Rene Hernandez-Vargas, and Oswaldo López for technical assistance.

This work was supported in part by INCO contract IC18CT980303 and CONACyT G36505-N.

REFERENCES

1. Agaisse, H., M. Gominet, O. A. Okstad, A.-B. Kolsto, and D. Lereclus. 1999. *PlcR* is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 32:1043-1053.
2. Aquino de Muro, M., and F. G. Priest. 1993. Phylogenetic analysis of *Bacillus sphaericus* and development of an oligonucleotide probe specific for mosquito-pathogenic strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 112:205-210.
3. Beveridge, T. J., P. H. Pouwels, M. Sara, A. Kofiranta, K. Lounatmaa, K. Kari, E. Kerosuo, M. Haapasalo, E. M. Egelseer, I. Schocher, U. R. Sleytr, L. Morelli, M.-L. Callegari, J. F. Nomellini, W. H. Bingle, J. Smit, E. Leibovitz, M. Lemaire, I. Miras, S. Salamitou, P. Beguin, H. Ohayon, P. Gounon, M. Matuschek, K. Sahn, H. Bahl, R. Grono-Thomas, J. Dworkin, M. J. Blaser, R. M. Woodland, D. G. Newell, M. Kessel, and S. F. Koval. 1997. Functions of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:99-149.
4. Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F. J. Villalobos, G. Peña, M.-E. Nuñez-Valdez, M. Soberón, and R. Quintero. 1998. Characterization of *ory* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4965-4972.
5. Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, and A. Bravo. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:353-356.
6. Ceron, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Güereca, and A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *oryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3826-3831.
7. Crickmore, N., D. R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo, and D. H. Dean. 2005. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [Online.] http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.
8. de Maagd, R., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore, and H. E. Schnepf. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37:409-433.
9. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP—Phylogeny Interference Package, version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
10. Fitch, W. M., and E. Margoliash. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 155:279-284.
11. Güereca, L., and A. Bravo. 1999. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochim. Biophys. Acta* 1429:342-350.
12. Hill, D. S. 1983. *Agricultural insect pests of the tropics and their control*, p. 438. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
13. Ibarra, J. E., M. C. del Rincón, S. Ordúz, D. Noriega, G. Benintende, R. Monnerat, L. Regis, C. M. F. de Oliveira, H. Lanz, M. H. Rodríguez, J. Sánchez, and A. Bravo. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5269-5274.
14. Kofiranta, A., M. Haapasalo, K. Kari, E. Kerosuo, I. Olsen, T. Sorsa, J. H. Muerman, and K. Lounatmaa. 1998. Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis and adherence to matrix protein of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. *Infect. Immunol.* 66:4895-4902.
15. Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gominet, and J. Chauvaux. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* *spoOA* mutant. *BioTechnology* 13:67-71.

16. Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux, and M.-M. Lecadet. 1989. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 60:211-218.
17. Luckevich, M. D., and T. J. Beveridge. 1989. Characterization of a dynamic S layer on *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 171:6656-6667.
18. Mesnage, S., E. Tosi-Couture, M. Mock, P. Gounon, and A. Fouet. 1997. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. Mol. Microbiol. 23:1147-1155.
19. Mesnage, S., E. Tosi-Couture, P. Gounon, M. Mock, and A. Fouet. 1998. The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 180:52-58.
20. Mesnage, S., M. Haustant, and A. Fouet. 2001. A general strategy for identification of S-layer genes in the *Bacillus cereus* group: molecular characterization of such a gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleria* NRRL 4045. Microbiology 147:1343-1351.
21. Mignot, T., S. Mesnage, E. Couture-Tosi, M. Mock, and A. Fouet. 2002. Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 43:1615-1627.
22. Msadek, T., F. Kunst, D. Henner, A. Klier, G. Rapoport, and R. Dedonder. 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. J. Bacteriol. 172:824-834.
23. Pei, Z., and M. J. Blaser. 1990. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Role of surface array proteins in virulence in a mouse model. J. Clin. Investig. 85:1036-1043.
24. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
25. Sára, M., and U. B. Sleytr. 2000. S-layer proteins. J. Bacteriol. 182:859-868.
26. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.
27. Sun, M., C. G. Zhu, and Z. Yu. 2001. Cloning of parasporal body protein gene resembling to S-layer protein genes from *Bacillus thuringiensis* CTC strain. Acta Microbiol. Sin. 41:141-147.
28. Travers, R. S., P. A. W. Martin, and C. F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 53:1263-1266.

APÉNDICE II

Medio mínimo SP

Volumen final 1 litro

Caldo nutritivo	8 g
MgSO ₄	0.25 g
KCL	1 g
Stock 1	1 ml
Stock 2	2 ml
Stock 3	1 ml

Disolver todos los reactivos en un volumen de 950 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7 con KOH 5M. Aforar a un litro con agua destilada, agregar 15 g de agar para medio sólido.

Stocks

1. Disolver 0.198 g de MnCl₂ 4H₂O en 100 ml de agua.
2. Disolver 9.15 g de FeSO₄ 7H₂ en 250 ml de agua
De un stock 1 N de H₂SO₄ tomar 7 ml y disolver en 250 ml de agua
3. Disolver 9.8 g de CaCl₂ 2H₂O en 100 ml de agua

APÉNDICE III

Dieta para *Manduca sexta*. Ingredientes para preparar 1 litro.

1.- Kappa carragenina 12.5 g o agar	20.0 g
2.- Agua destilada	1000 ml
3.- Germen de trigo	80.0 g
4.- Caseinato o caseína	36.0 g
5.- Sacarosa	32.0 g
6.- Levadura	16.0 g
7.- Sales Wesson	12.0 g
8.- Acido sórbico	2.0 g
9.0 Acido ascórbico	4.0 g
10.0 Methyparaben	1.0 g
11.- Colesterol	3.0 g
12.- Vitaminas Vanderzant	10.0 g ó
13.- Solución vitamínica*	10.0 ml
14.- Tetraciclina	0.25 g
15.- Formaldehído al 37%	1.0 ml
16.- Aceite de linaza o vegetal	4.0 ml

*Ingredientes para preparar 400 ml de solución vitamínica.

1.- Pentotenato de calcio	4.8 g
2.- Niacinamida	2.31 g
3.- Riboflavina	1.2 g
4.- Acido fólico	0.6 g
5.- Tiamina	0.6 g
6.- Biotina	0.048 g
7.- Hidroxocolsalamina (axofort)	10.0 g
8.- Agua destilada	400.0 ml

Mezclar muy bien todos los ingredientes, agitar, aforar a 400.0 ml. Guardar en frasco ambar y en refrigeración.

APÉNDICE IV

Dieta Meridica para alimentar a *Spodoptera frugiperda*. Cantidades para preparar un litro.

1.- Agar	15.0 g
2.- Agua destilada	1000 ml
3.- Harina de soya	71.1 g
4.- Germen de trigo	31.7 g
5.- Sales Wesson	10.6 g
6.- Sacarosa	13.0 g
7.- Methylparaben	1.6 g
8.- Acido sórbico	1.0 g
9.- Acido ascórbico	4.3 g
10.- Solución vitamínica*	3.5 ml+
11.- Acido acético 25%	12.0 ml+
12.- Formaldehído 10%	4.4 ml+
13.- Cloruro de colina 15%	7.3 ml+

+ Agregar cuando la temperatura haya bajado a menos de 40°C.

Preparación.

- 1.- El agar se licua con el agua hirviendo.
- 2.- Se funde tres veces en el horno de microondas.
- 3.- Se licua el agar con los ingredientes secos.
- 4.- Llenar los recipientes antes de que solidifique.

APÉNDICE V

Técnica para realizar la transferencia de proteína a membrana PDVF en cámara Semiseca:

- 1.- Poner la membrana en Metanol absoluto de 5 a 20 segundos.
- 2.- Pasar a buffer III entre 15 y 20 minutos o media hora, para equilibrar (no dejar secar).
- 3.- sacar gel y poner en Buffer II por 15 minutos.
- 4.- Hacer sandwich para electroforesis semiseca. Se ponen 3 pedazos de papel filtro (8X7cm) humedecido con el Buffer I, sobre estos se ponen 6 pedazos de papel filtro humedecidos con el buffer II, se coloca el gel (con la parte de enfrente hacia arriba), luego la membrana previamente marcada para saber donde que la parte de enfrente y finalmente 6 pedazos de papel filtro humedecidos en Buffer III.
- 5.- Tiempo de transferencia 50 minutos, 56 mA.

Buffer I	II	III	
Tris	36.3g	3.0g	3.0g
SDS	50.0mg	50.0mg	50.0mg
Metanol	100.0ml	100.0ml	100.0ml
Glicina			3.0g

APÉNDICE VI

Medio LB (Luria-Bertani)

Volumen final 1 litro

Bacto-triptona 10 g

Bacto-extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Bacto agar para medio sólido 15 g

Disolver en 500mL de agua destilada, si se prepara, sólido agregar 15g de agar y aforar a 1L. Esterilizar en autoclave 20 min a 15 lb/sq.

APÉNDICE VII

Resultados de los bioensayos contra *E. varivestis* utilizando las cepas de las diferentes colecciones.

CEPA	%MORTALIDAD DOSIS 1000ng/cm ²
IB5	10
IB6	10
IB7	5
IB24	5
IB37	15
IB46	20
IB49	10
IB51	15
IB64	15
IB65	15
IB68	5
IB111	10
IB122	10
IB131	5
IB137	0
IB141	5
IB142	5
IB150	0
IB151	0
IB173	0
IB175	15
IB194	10
1B200	0
IB203	15
IB205	10
IB209	50
IB212	15
IB220	0
IB229	15
IB230	20
IB233	20
IB234	70
IB241	10
IB244	5
IB253	15
IB255	20
IB256	10
IB262	60
IB278	15
IB280	20
IB281	70

IB293	65
IB310	5
IB312	60
IB366	0
IB386	0
IB387	15
IB392	5
IB426	20
IB436	0
IB441	5
IB456	0
IB466	10
IB470	5
IB473	10
IB476	50
IB477	70
IB481	0
IB486	5
BTS1	10
BTS00125L	5
BTS02260A	0
BTS02109P	20
BT2001371	0
2134N	50
306B	55
450D	0
349U	10
677C	0
861	10
2507A	0
2592AA	10
186B	10
516QA	5
1201AS	10
591D	20
567AA	10
276D	10
2351AA2	20
181M	20
262B	20
130AG	25
1102B	20
2289	30
253C	5
2330B	10
2431	5

831Cblanca	5
831Cparda	10
198AV	5
1058C	20
3800A	0
2584C	95
186B	10
2435B	0
1060D	10
354A	5
2179A	55
2516AA	10
1056W	15
2065C	0
7024E	0
766TE	5
2178B	15
501AA	10
1011J	20
2452K	0
2265A	0
253Z	0
591A	10
2210W	10
330H	0
2271	20
958B	10
2331C	5
2701M	0
1099E	10
1011Q	0
2185S	20
469A	5
756TQ	0
2231A	10
9870G	0
607K	15
203AB	15
484F	0
604AA	0
237G	0
2198O	10
444E	0
2212A	0
2242A	10
504A	10

3728B	0
1176T	0
213M	0
586M	0
311M	0
2377A	0
390AK	0
365A	0
877A	10
352C	0
1224J	0
212	0
1025D	0
162V	0
1168O	10
420B	0
1090O	10
2170Q	10
1225A	0
251V	0
3266AA	45
2331D	5
2300A	10
835D	0
1219CA	0
1088A	15
446A	0
327D	5
2216F	0
3400AAblan.	10
3400AApar.	10
702AE	0
BTS1	10
BTS00125L	5
BTS02260A	0
BTS01209P	20
BTS00137J	0
2134N	50
306B	55
1023W	25
828C	25
381I	20
335AB	10
2209AD	20
2134N	50
350B	5

306G	60
2210W	15
327D	20
9870W	25
1177B	10

APENDICE VIII

Resultado de los bioensayos para calcular las CL_{50} de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* aisladas de cadáveres de larva de *E. varivestis*.

CEPA *Epilachna* CL_{50} 13.4 ng/cm² 8.47271 20.49967

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	2	1	1	2	14	6
10	20	1	2	3	2	12	8
15	20	5	2	2	0	11	9
20	20	3	2	3	4	8	12
25	20	5	5	3	4	3	17
30	20	5	4	5	5	1	19
TESTIGO	20	0	1	1	0	18	2

CEPA *Epilachna* CL_{50} 12.6 ng/cm² 7.97164 19.17852

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	3	2	2	1	12	8
10	20	0	1	4	4	11	9
15	20	2	3	3	4	8	11
20	20	2	1	4	3	10	10
25	20	4	4	3	3	6	14
30	20	5	5	5	4	1	19
TESTIGO	20	1	0	0	0	19	1

CEPA *Epilachna* CL₅₀ 20.3 ng/cm² 12.02071 35.20724

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	2	0	1	5	12	8
10	20	0	3	0	4	13	7
15	20	4	1	3	1	12	8
20	20	2	2	2	2	12	8
25	20	0	2	5	2	11	9
30	20	4	5	3	2	6	14
TESTIGO	20	0	0	0	0	20	0

CEPA 6 1° CL₅₀ 17.9 ng/cm² 11.35275 35.48268

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	1	1	1	3	14	6
10	20	1	4	2	1	12	8
15	20	2	3	3	3	9	11
20	20	3	3	4	2	8	12
25	20	2	5	2	4	7	13
30	20	5	3	4	5	3	17
TESTIGO	20	0	0	0	0	20	0

CEPA 6 1° CL₅₀ 5.6 ng/cm² 2.71545 10.43648

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	1	1	1	3	14	6
10	20	1	4	2	1	12	8
15	20	2	3	3	3	9	11
20	20	3	3	4	2	8	12
25	20	2	5	2	4	7	13
30	20	5	3	4	5	3	17
TESTIGO	20	0	0	0	0	20	0

CEPA 6 1° CL₅₀ 6.4 ng/cm² 3.15706 11.78579

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	1	1	1	3	14	6
10	20	1	4	2	1	12	8
15	20	2	3	3	3	9	11
20	20	3	3	4	2	8	12
25	20	2	5	2	4	7	13
30	20	5	3	4	5	3	17
TESTIGO	20	0	0	0	0	20	0

CEPA 3 2° CL₅₀ 7.5 ng/cm² 4.45655 11.72368

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	2	3	1	3	11	9
10	20	2	3	1	5	9	11
15	20	4	4	4	2	6	14
20	20	3	4	4	5	4	16
25	20	4	5	4	3	4	16
30	20	5	2	5	5	3	17
TESTIGO	20	0	0	0	0	20	0

CEPA 3 2° CL₅₀ 15.8 ng/cm² 9.18579 27.28283

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	2	0	0	0	18	2
10	20	3	1	0	3	13	7
15	20	0	1	4	3	12	8
20	20	1	5	2	2	10	10
25	20	3	2	4	3	8	12
30	20	3	4	5	2	6	14
TESTIGO	20	0	1	0	0	20	1

CEPA 3 2° CL₅₀ 17.2 ng/cm² 10.05401 29.82148

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	0	1	0	1	18	2
10	20	0	3	2	0	15	5
15	20	3	1	2	2	12	8
20	20	3	2	2	4	9	11
25	20	4	3	3	2	8	12
30	20	5	3	5	2	5	15
TESTIGO	20	0	0	2	0	18	2

CEPA 8 1° CL₅₀ 13.3 ng/cm² 7.10751 24.74586

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	3	0	2	3	12	8
10	20	1	3	3	2	11	9
15	20	0	1	2	0	17	3
20	20	1	4	3	2	10	10
25	20	3	3	3	4	7	13
30	20	4	4	4	3	6	14
TESTIGO	20	0	0	0	0	20	0

CEPA 8 1° CL₅₀ 8.6 ng/cm² 4.46074 15.95289

DOSIS	TOTAL DE LARVAS	LARVAS MUERTAS				TOTAL LARVAS	
		R1	R2	R3	R4	VIVAS	MUERTAS
5	20	2	0	3	1	14	6
10	20	0	1	2	2	15	5
15	20	3	3	1	3	10	10
20	20	4	4	3	1	8	12
25	20	3	4	4	2	7	13
30	20	2	4	5	3	6	14
TESTIGO	20	1	0	0	0	20	0

BIBLIOGRAFIA

Agaisse, H., M. Goiminet, A. B. Okstad, A. B. Kolsto y D. Lereclus. 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*. 23: 1043-1053.

Aguino de Muro, M. y F. G. Priest. 1993. Phylogenetic analysis of *Bacillus sphaericus* and development of an oligonucleotide probe specific for mosquito-pathogenic strains. *FEMS Microbiological Letters*. 112 (2): 205-210.

Angus, T. A. y J. A. Norris. 1968. A comparison of the toxicity of some varieties of *Bacillus thuringiensis* Berliner for silkworm larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 11: 289-295.

Arenas-Sosa, I. 2010. El papel de la fosfatasa alcalina de *Manduca sexta* en el mecanismo de toxicidad de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Doctorado. Instituto De Biotecnología/UNAM. 134p.

Aronson, A. I., W. Beckman y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews*. 50 (1): 1-24.

Aronson, A. I. y Y. Shai. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*. 195 (1): 1-8.

Beegle, C. C. y T. Yamamoto. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Canadian Entomologist*. 124: 587-616

Bagla, P. 2010. Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM Crops. *Science*. 327 (5972): 1439.

Benbrook, C. M. 2004. Genetically engineered crops and the use of pesticides in the U.S.: The first nine years. BioTech InfoNet. Technical Paper No. 7. 53 pp.

Benbrook, C. 2009a. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the United States: the first thirteen years. The Organic Center. 1-69.

Benbrook, C. 2009b The magnitude and impacts of the use of the biotech and organic seed price premium. Critical issue report. The seed price premium. The Organic Center. 1-14.

Beveridge, T., P. H. Pouwels, M. Sara, A. Kotiranta, K. Lounatmaa, K. Kari, E. Kerouso, E. M. Egelseer, I. Schocher, U. B. Sleytr, L. Morelli, M. L. Callegari, J. F. Nomellini, W. H. Bingl, J. Smith, E. Leibovitz, M. Lemaire, I. Miras, S. Salamitou, P. Beguin, H. Ohayon, P. Gounon, M. Matuschek, K. Sahm, H. Bahl, R. Grogono-Thomas, J. Dworkin, M. J. Blaser. R. M. Woodland, D. G. Newell, M. Kessel y S. F. Koval. 1997. Functions of S-layer. *FEMS Microbiology Reviews*. 20(1-2): 99-149.

- Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat, y J. Lescar. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. *Journal of Bacteriology*. 188 (9): 3391-3401.
- Bor, Y. J. 1997. Some evidence for the existence of dynamic economic thresholds. *Agricultural Systems*. 53 (2-3): 143-160
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1-2): 248-254.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. López, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz. M. Ortiz, L. Lina, F. J. Villalobos, G. Peña, M. E. Nuñez-Valdez, M. Soberón, y R. Quintero. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (12): 4965-4972.
- Bravo, A., J. Sánchez, T. Kouskoura y N. Crickmore. 2002. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* CryAc insecticidal toxin. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (27): 23985-23987.
- Bravo, A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill y M. Soberón. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxina to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1667: 38-46.
- Bravo, A., M. Soberón y S. S. Gill. 2005. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use. En: *Comprehensive Molecular Insect Science Control*. L I. Gilbert, K. Iatrou y S. S. Gill (Eds.). Elsevier. Primera Edición. 175-205 pp.
- Briggs, C. J. y H. C. J. Godfray. 1996. The dynamics of insect-pathogen interactions in seasonal environments. *Theoretical Population Biology*. 50: 149-177.
- Broadhurst. M. D. 1998. The influence of the molecular basis of resistance on insecticide discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 353: 1723-1728.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypothesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(5): 2415-2422.
- Caldas de Castro, M., R. L. Monte-Mór, D. O. Sawyer y B. H. Singer. 2006. Malaria risk on the Amazon frontier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103 (7): 2452-2457.

- Cantwell, G. E. y W. W. Cantello. 1982. Potential of *Bacillus thuringiensis* as a microbial agent against the Mexican bean beetle. *Journal of Economic Entomology*. 75: 348-350.
- Cattaneo, M. A., C. Yafuso, C. Schmidt, C. Huang, M. Rahman, Carl Olson, C. Ellers-Kirk, B. J. Orr, S. E. Marsh, L. Antilla, P. Dutilleul y Y. Carrière. 2006. Farm-scale evaluation of impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 103 (20): 7571-7576.
- Casida, J. E. y G. B. Quistad. 1998. Golden age of insecticide research. Past, present and future. *Annual Review of Entomology*. 43: 1-16.
- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, y A. Bravo. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal cristal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (1): 353-356.
- Ceron, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca, y A. Bravo. 1995. Specific PCR reaction primers directed to identify *cry I* and *cry III* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (11): 3826-3831.
- Chilcott, C. N. y P. J. Wigley. 1994. Oppotunities for finding new *Bacillus thuringiensis* strains. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 49(1): 51-57.
- Claus, H., E. Akça, T. Debaerdemaeker, C. Evrard, J. P. Declercq, J. R. Harris, B. Schlott y H. König. 2005. Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Canadian Journal of Microbiology*. 51(9): 731-743.
- Conner, A. J., T. R. Glare y J.P. Nap. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *The Plant Journal*. 33 (1): 19-46.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3): 807-813.
- Crickmore, N. 2000. The diversity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. En *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. J. F. Charles, D. Lerecluse y C. Nielsen-Le Roux (Eds.). 65-79 pp.
- Crickmore, N. 2005. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *TRENDS in Microbiology*. 13 (8): 347-350.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo y D. H. Dean. 2010. <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/NeilCrickmore/Bt/index.html>

- Damgaard, P. H. 2000. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. En: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. J. F. Charles, D. Lerecluse y C. Nielsen-Le Roux (Eds.). 23-40 pp.
- de la Paz, G. S., G. A. Martínez y R. R. Reyna. 1975. El rendimiento del frijol, en función del grado del daño de la conchuela *Epilachna varivestis*. Agrociencia. 22: 25-38.
- de Maagd, R. A. 2002. Environmental impact of insect-resistant plants expressing a *Bt* toxin. II Non-target effects (Update) and *Bt* resistance in target insects. Note 218. Plant Research International B. V., Wageningen, The Netherlands. 62 pp.
- de Maagd, R. A., D. Bosch y W. Stiekema. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. Trends in Plant Science. 4 (1): 9-12.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize insect world. Trends in Genetics. 17(4): 193-199.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore y H. E. Schnepf. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annual Review of Genetics. 37: 409-433.
- Delmer, D. P. 2005. Agriculture in the developing world: connecting innovations in plant research to downstream applications. Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America. 102 (44): 15739-15746.
- Dich, J., S. Hoar Zahm, A. Hanberg y H. O. Adami. 1997. Pesticides and cancer. Cancer Causes and Control. 8 (3): 420-443.
- Dobrin, G. C. y R. B. Hammond. 1983. Residual activity of selected insecticides against the adult Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae) on soybeans. Journal of Economic Entomology. 76: 1456-1459
- Duan, J. J., M. Marvier, J. Huesing, G. Dively, y Z. Y.Huang. 2008. A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). PLoS ONE 3(1): e1415. doi:10.1371/journal.pone.0001415.
- Dulmage, H. T. 1970. Insecticidal activity of HD1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. Journal of Invertebrate Pathology. 15: 232-239.
- Dulmage, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. En: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. H. D. Burges (Ed.). Academic Press 193-222 pp.

- Ellis, R. T., B. A. Stockhoff, L. Stamp, H. E. Schnepf, G. E. Schwab, M. Knuth, J. Russell, G. Cardineau, y K. E. Narva. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (3): 1137-1145.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig y M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 93(11): 5389-5394.
- Fast, P.G. 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. En: *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. H. D. Burges (Ed.). Academic Press. 223-248 pp.
- Federici, B. A. 2005. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89 (1): 30-38.
- Fedhila, S., E. Guillemet, P. Nel y D. Lereclus. 2004. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* genes identified by in vivo screening of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (8): 4784-4791.
- Feitelson, J. S., J. Payne y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology*. 10: 271-275
- Felsenstein, J. 1993. Phylip-Phylogeny interference package. Version 3.5c (Distributed by J. Felsenstein, Department of Genetics, University of Washington, Seattle).
- Ferré, J. y J. Van Rie. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*. 47: 501-533
- Ferré, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Jansens y M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (12): 5119-5123.
- Ferry, N., M. G. Edwards, J. A. Gatehouse y A. M. R. Gatehouse. 2004. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*. 15 (2): 155-161.
- Fitch, W. M. y E. Margoliash. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science*. 155 (3760): 279-284.
- Foley, J. A., R. DeFries, G. P. Asner, C. Barford, G. Bonan, S. R. Carpenter, F. S. Cahapin, M. T. Coe, G. C. Daily, H. K. Gibbs, J. H. Helkowski, T. Holloway, E. A. Howard, C. J. Kucharik, C. Monfreda, J. A. Patz, I. C.

Prentice, N. Ramankutty y P. K. Snyder. 2005. Global consequences of land use. *Science*. 309 (5734): 570-574.

Forrester, N. W. 1994. Use of *Bacillus thuringiensis* in integrated control, especially on cotton pests. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 49 (1): 77-83

Frank, A. L., R. McKnight, R. S. Kirkhorn y P. Gunderson. 2004. Issues of agricultural safety and health. *Annual Review of Public Health*. 25: 225-245.

Frutos, R., C. Rang y M. Royer. 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Critical Reviews in Biotechnology*. 19 (3): 227-276.

Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn y L. English. 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica Section D*. 57(8): 1101-1109

Georghiou, G. P. y A. Lagunas-Tejeda. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. An index of cases reported through 1989. Food and Agricultural Organization of the United Nations. 318 p.

Godfray, H. C. J., J. R. Beddington, I. R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J. F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S. M. Thomas y C. Toulmin. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 327 (5967): 812-818.

Gou, S., S. Ye, Y. Liu, L. Wei, J. Xue, H. Wu, F. Song, J. Zhang, X. Wu, D. Huang y Z. Rao. 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *Journal of Structural Biology*. 168 (2): 259-266.

Gratz, N. G. 1999. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annual Review of Entomology*. 44: 51-75.

Griffitts, J. S. y R. V. Aroian. 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins. *BioEssays*. 27 (6): 614-624.

Griffitts, J. S., S. M. Haslam, T. Yang, S. F. Garczynski, B. Mulloy, H. Morris, P. S. Cremer, A. Dell, M. J. Adang y R. F. Aroian. 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*. 307 (5711): 922-925.

Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J. L. Shwartz, R. Brousseau y M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*. 254 (3): 447-464.

Guo, G., L. Zhang, Z. Zhou, Q. Ma, J. Liu, Ch. Zhu, L. Zhu, Z. Yu y M. Sun. 2008. A new group of parasporal inclusions encoded by the S-layer gene of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiology Letters. 282 (1): 1-7

Guereca, L. y A. Bravo. 1999. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. Biochemistry and Biophysical Acta. 1429. 342-350.

Guicherit, R., D. J. Bakker, P. de Voogt, F. van Den Berg, H. F. G. van Dijk y W. A. J. van Pul. 1999. Environmental risk assessment for pesticides in the atmosphere; the results of an international workshop. Water, Air, and Soil Pollution. 115 (1-4): 5-19.

Hansen, B. M., P. H. Damgaard, J. Eilenberg y J. C. Pedersen. 1998. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. Journal of Invertebrate Pathology. 71: 106-114.

Hansen, B. M. y S. Salamitou, 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. En: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. J. F. Charles, D. Lerecluse y C. Nielsen-Le Roux (Eds.). 41-63 pp.

Heller, M. C. y G. A. Keoleian. 2003. Assessing the sustainability of the US food system: a life cycle perspective. Agricultural Systems. 76 (3): 1007-1041.

Hofte, H. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53: 242-255.

Hoy, M. H. 1998. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. 353 (1375): 1787-1795.

Ibarra, J. E., M. C. Del Rincón Castro, E. Galindo, M. Patiño, L. Serrano, R. García, J. A. Carrillo, B. Pereyra-Alfárez, A. Alcázar-Pizaña, H. Luna-Olvera, L. Galán-Wong, L. Pardo, C. Muñoz-Garay, I. Gómez, M. Soberón y A. Bravo. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Revista Latinoamericana de Microbiología. 48 (2): 113-120.

Itoua-Apoyolo, C., L. Drif, J. M. Bassal, H. DeBarjac, J. P. Bossy F. Leclant y R. Frutos. 1995. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the european sunflower moth *Homoeosoma nebulella*. Applied and Environmental Microbiology. 61 (12): 4343-4347.

James, C. 2005. Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2005. Brief 34. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. 12pp.

Janmaat, A. F. y J. Myers. 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proceedings of the Royal Society of London B. 270 (1530): 2263-2270.

- Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 195-219.
- Joung, K., y J. C. Côté. 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Horticultural Research and Development Centre. Agriculture and Agri-Food Canada. Technical Bulletin No. 29. 1-16.
- Knight, P., N. Crickmore, y D. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CrlA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*. 11(3): 429-436.
- Knowles, B. H. y J. A. T. Dow. 1993. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*. 15 (7): 469-476.
- Koziel, M. G., N. B. Carozzi, T. C. Currier, G. W. Warren y S. V. Evola. 1993. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: past, present and future uses. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. II: 173-228.
- Kotiranta, A., M. Haapasalo, K. Kari, E. Kerosuo, I. Olsen y T. Sorsa. 1998. Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis and adherence to matrix protein of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. *Insect Immunology*. 66: 3895-4902.
- Kubota, Y., A. Ohgushi, A. Uemori, E. Mizuki y M. Ohba. 2006. Identification of two haemolysins in larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* against the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Journal of Applied Entomology*. 130 (3): 183-189.
- Lacey, L. A., R. Frutos, H. K. Kaya y P. Vails. 2001. Insect control pathogens as biological control agents: Do they have a future?. *Biological Control*. 21 (3): 230-248.
- Lacey, L. A. y D. I. Shapiro-Ilan, 2008. Microbial control of pests in temperate orchard systems: potential for incorporation into IPM. *Annual Review of Entomology*. 53: 121-144.
- Lecadet, M. M., M. O. Blondel y J. Ribier. 1980. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715, using bacteriophage CP54 Ber. *Journal General Microbiology*. 121: 202-121.
- Lee, M. K., F. S. Walters, H. Hart, N. Palekar y J. E. Chen. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (8): 4648-4657.

Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux y M. M. Lecadet. 1989. Transformation and expresión of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiological Letters. 60 (2): 211-218.

Lewis, W. J., J. C. van Lenteren, S. C. Phatak y H. Tumlinson. 1997. A total system approach to sustainable pest management. Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America. 94 (23): 12243-12248.

Li, J., J. Carroll y D. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature. 353 (6347): 815-821.

Li, J., P. A. Koni y D. J. Ellar. 1996. Structura of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. Journal of Molecular Biology. 257 (1): 129-152.

Lord, J. C. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. Journal of Invertebrate Pathology. 89 (1): 19–29.

Lu, Y., K. Wu, Y. Jiang, B. Xia, P. Li, H. Feng, K. A. G. Wyckhuys y Y. Guo. 2010. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of *Bt* cotton in China. Science. 328 (5982): 1151-1154.

Luthy, P. y M. G. Wolfersberger. 2000. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. En: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. J. F. Charles, A. Lerécluse y C. Nielsen-Le Roux (Eds.). 167-179 pp.

Lynch, R. E., L. C. Lewis y T. A. Brindley. 1976. Bacteria associated with eggs and first-instar larvae of the European corn borer: isolation techniques and pathogenicity. Journal of Invertebrate Pathology. 27: 325-331.

Mahon, R. J., K. M. Olsen y S. Downes. 2008. Isolation of Cry2Ab resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) are allelic. Journal of Economic Entomology. 101 (3): 909-914.

Margni, M., D. Dossier, P. Crettaz y O. Jolliet. 2002. Life impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. 93 (1-3): 379-392.

Mastache-Piña, Y. 2009. Perfil proteico del cristal y actividad insecticida de cepas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Guerrero. 70 pp.

Matson, P. A., W. J. Parton, A. G. Power y M. J. Swift. 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. Science. 277 (5325): 504-09.

Matsumura, F. 2004. Contemporary issues on pesticide safety. Journal of Pesticide Science. 29 (4): 299-303.

McCaffery, A. R. 1998. Resistance to insecticides in Heliothine Lepidoptera: a global view. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 353 (1375): 1735-1750.

Mckeon, T. 2003. Genetically modified crops for industrial products and processes and their effects on human health. *Trends in Food Science & Technology*. 14 (5-8): 229-241.

Mensnage, S., E. Tosi-Couture, M. Mock, P. Gounon, M. Mock, y A. Fouet. 1997. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component : evidence that it is the major cell-associated antigen. *Molecular Microbiology*. 23: 1147-1155.

Mensnage, S., E. Tosi-Couture, M. Mock, P. Gounon, M. Mock y A. Fouet. 1998. The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*. 180(1): 52-58.

Mensnage, S., M. Haustant y A. Fouet. 2001. A general strategy for identification of S-layer genes in the *Bacillus cereus* group: molecular characterization of such gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleria* NRRL 4045. *Microbiology*. 147(part5): 1343-1351.

Michels Jr., G. J., y C. C. Burkhardt. 1981. Economic threshold levels of the mexican bean beetle on pinto beans in Wyoming. *Journal of Economic Entomology*. 74: 5-6.

Mignot, T., S. Mensnage, E. Couture-Tosi, M. Mock y A. Fouet. 2002. Developmental swich of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*. 43(6): 1615-1627.

Milner, R. J. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 49 (1): 9-13.

Morin, X. K. 2008. Genetically modified food from crops: progress, paws, and possibilities. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 392 (3): 333-340.

Morse, R. J., T. Yamamoto, y R. M. Stroud. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*. 9 (5): 409-417.

Msadeck, T., F. Kunst, D. Henner, A. Klier, G. Rapoport y R. Dedonder. 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expresion of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *Journal of Bacteriology*. 172: 824-834.

Mullin, C. A., M. Frazier, J. L. Frazier, S. Ashcraft, R. Simonds, D. vanEngels dorp y J. S. Pettis. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in north american Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE* 5(3): e9754. doi:10.1371/journal.pone.0009754

Musser, R. O., S. M. Hum-Musser, G. W. Felton y R. C. Gergerich. 2003. Increased of larval growth and preference for virus-infected leaves by the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant, a plant virus vector. *Journal of Insect Behavior*. 16 (2): 247-256.

Nap, J. P., L. J. Metz, M. Escalar y A. J. Conner. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part I. Overview of current status and regulations. *The Plant Journal*. 33 (1): 1-18.

National Academy of Sciences. 2000. Genetically modified pest-protected plants: Science and regulation. National Academy Press. USA. 292 p.

National Academy of Sciences. 2003. The future use of pesticides in US agriculture. National Academy Press. USA. 332 p.

Nester, E. W., L. A. Thomashow, M. Metz y M. Gordon. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical scientific assessment. A report from the American Academic of Microbiology. 1-18.

Oliveira, M. R. V., T. J. Henneberry y P. Anderson. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*. 20 (9): 709-723.

Otsuka, Y. 2003. Socioeconomic considerations relevant to the sustainable development, use and control of genetically modified foods. *Trends in Food Science & Technology*. 14 (5-8): 294-318.

Pacheco, S., I. Gómez, I. Arenas, G. Saab-Rincon, C. Rodríguez-Almazán, S. S. Gill, A. Bravo y M. Soberón. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 284: 32750-32757

Palumbi, S. R. 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*. 293 (5536): 1786-1790.

Paoletti, M. G. y D. Pimentel. 2000. Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 12 (3): 279-303.

Parris, T. M. y R. Kates. 2003. Characterizing a sustainability transition: Goals, targets, trends, and driving forces and transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (14): 8068-8073.

Peferoen, M. 1997. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. *TIBTECH*. 15: 173-178.

- Pei, Z. y M. J. Blaser. 1990. Patogénesis of *Clampylobacter fetus* infections. Role of surface array proteins in virulence in a mouse model. *Journal of Clinical Investigation*. 85(4): 1036-1043.
- Pérez, C., L. E. Fernández, J. Sun, J. L. Folch, S. S. Gill, M. Soberon y A. Bravo. *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* Cyt1Aa synergizes Cr11Aa toxin by functioning as membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (51): 18303-18308.
- Perlak, F. J., R. W. D, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greeplate y D. A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*. 9. 939-943.
- Peters, A. J., K. C. Jones, R. J. Flower, P. G. Appleby, M. Ramdani, M. M. Kraiem y A. A. Fathi. 2001. Recent environmental change in North African wetland lakes: a baseline study of organochlorine contaminant residues in sediments from nine sites in the CASSARINA Project. *Aquatic Ecology*. 35 (3-4): 449-459.
- Pinto, L. M. N., A. O. Azambuja, E. Diehl y L. M. Fiuza. 2003. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Brazilian Journal of Biology*. 63 (2): 301-306.
- Pittendrigh, B. R. y P. J. Gaffney. 2001. Pesticide resistance: Can we make it a renewable resource?. *Journal of Theoretical Biology*. 211: 365-375.
- Porcar, M., I. García-Robles, L. Domínguez-Escribà y A. Latorre. 2010. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab y Cry3Aa endotoxins on predatory coleóptera tested through artificial diet-incorporation bioassays. *Bulletin of Entomological Research*. 100 (3): 297-302. doi:10.1017/S0007485309990290.
- Porter, A. G., E. W. Davidson y J. W. Liu. 1993. Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiological Reviews*. 57 (4): 838-861.
- Pretty, J. 2001. The rapid emergence of genetic modification in world agriculture: contested risks and benefits. *Environmental Conservation*. 28 (3): 248-262.
- Priest, F. G. 2000. Biodiversity of entomopathogenic, endospore-forming bacteria. En: *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. J. F. Charles, A. Lerécluse y C. Nielsen-Le Roux (Eds.). 1-22 pp.
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra y R. K. Bhatnagar. 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (49): 46849-46851.

Rang, C., P. Gil, N. Neisner, J. van Rie y R. Frutos. 2005. Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. 71(10): 6276-6281.

Rocha, R. R., K. F. Byerly M., R. Bujanos M. y M. Villarreal G. 1990. Manejo integrado de la palomilla de la papa *Phthorimeae operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Guanajuato. Campo Experimental Bajío, Celaya. Guanajuato, México. 50p.

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

Rosas-García, N. M., M. Mireles-Martínez, J. L. Hernández-Mendoza and J. E. Ibarra. 2008. Screening of *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from avocado orchards in Mexico, and their insecticidal activity towards *Argyrotaenia* sp. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. Journal of Applied Microbiology. 104: 224-230.

Rossing, W. A. H. y K. L. Heong. 1997. Opportunities for using systems approaches in pest management. Field Crop Research. 51: 83-100.

Ruttan, V. W. 1999. The transition to agricultural sustainability. Proceedings of the National. Academy Sciences of the United States of America. 96 (11): 5960-5967.

Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sara, M. y U. B. Sleytr. 2000. S-layer proteins. Journal of Bacteriology. 182(4): 859-868.

Sayed, A. H., H. Cerda y D. J. Wright. 2003. Could *Bt* transgenic crops have nutritionally favourable effects on resistant insects?. Ecology Letters. 6 (3): 167-169.

Schaffer, K. S., M. Reeves, S. Spitzer y S. E. Kegley. 2004. Chemical trespass pesticides in our bodies and corporate accountability. Pesticide Action Network North America. 56 pp.

Schechter, A., P. Toniolo, L. C. Dai, L. T B. Thuy y M. S. Wolff. 1997. Blood levels of DDT and breast cancer risk among women living in the north of Vietnam. Archives on Environmental Contamination and Toxicology. 33 (4): 453-456.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler y D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62 (3): 775-806.

- Schuster, B. y U. B. Sleytr. 2009. Composity S-layer lipid structures. *Journal of Structural Biology*. 168: 207-216.
- Sebasta, K., J. Farkas, K. Horska y J. Vankova. 1981. Thuringiensin, the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. En: *Microbial control of pests and diseases 1970-1980*. H. D. Burges (Ed.). Academic Press. 249-281 pp.
- Serageldin, I. 1999. Biotechnology and food security in the 21st century. *Science*. 285 (5426): 387-389.
- Shelton, A. M., J.Z. Zhao y R. T. Roush. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annual Review of Entomology*. 47: 845-881.
- Smith, R. A. y G. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(1): 311-315.
- Spiroux de Vendômois, J., F. Roullier, D. Cellier y G. E. Séraline. 2009. A comparison of the effects of three GMO corn varieties on mammalian health. *International Journal of Biological Sciences*. 5 (7): 706-726.
- Starnes, R. L., C. Liu y P. G. Marrone. 1993. History, use, and future of microbial insecticidas. *American Entomologist*. Summer. 83-91.
- Steinhaus, E. A. 1956. Microbial control.-the emergence of an idea. A brief history of insect pathology through the nineteenth century. *Hilgardia* 26 (2): 107-149.
- Sun, M., C. G. Zhu y Z. Yu. 2001. Cloning of parasporal body protein gene resembling to S-layer protein genes from *Bacillus thuringiensis* CTC strain. *Acta Microbiologica Sinica*. 41: 141-147.
- Suzuki, S., T. Otani, S. Iwasaki, K. Ito, H. Amura y Y. Tanaka. 2003. Monitoring of 15 pesticides in rainwater in Utsunomiya, eastern Japan, 1999-2000. *Journal of Pesticide Science*. 28 (1): 1-7.
- Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson y N. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*. 83 (5): 1671-1676.
- Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*. 39. 47-79.
- Tabashnik, B. 2007. Delaying insect resistance to transgenic crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (49): 19029-19030.

- Tabasnik, B. E., Y.-B. Liu, T. Malvar, D. G. Heckel, L. Masson, V. Ballester, F. Granero, J. L. Ménsua y J. Ferré. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (24): 12780-12785.
- Tabashnik, B. E., J. B. J. Van Rensburg y Y. Carrière. 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory and data. *Journal of Economic Entomology*. 102 (6): 2011-2025.
- Tait, J. 2001. Pesticide regulation, product innovation and public attitudes. *Journal of Environmental Monitoring*. 3: 64n-69n. DOI.10.103/B105803G.
- Tamez-Guerra, P, L. J. Galan-Wong, H. Medrano-Roldán, C. García-Gutiérrez, C. Rodríguez-Padilla, R. A. Gómez-Flores, y R. S. Tamez-Guerra. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*. IV (2): 143-152.
- Tanada, Y. y H. K. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academia Press. 83-122 p.
- Tenorio, V., M. C., y J. L. Carrillo S. 1987. Parasitismo de *Aplomyopsis epilachninae* (Diptera: Tachinidae) sobre *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae) en Chapingo, México. *Folia Entomologica Mexicana*. 73: 141-146.
- Thomas, M. B. 1999. Ecological approaches and the development of “truly integrated pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (11): 5944-5951 pp.
- Thomson, J. 2003. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. *Trends in Food & Technology* 14 (5-8): 210–218.
- Tilman, D. 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 96 (11): 5995-6000.
- Tortora, G.J., B. R. Funke y C. L. Case. 1998. *Microbiology. An introduction*. 6a Ed. Addison Wesley Longman, Inc. 398 pp.
- Travers, R. S., P. A. W. Malathi y C. F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus sp.* *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 1263-1266.
- Urech, P. A., T. Staub y G. Voss. 1997. Resistance as a concomitant of modern crop protection. *Pesticide Science*. 51 (3): 227-234.
- Upreti, R. K., M. Kumar y V. Shankar. 2003. Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications. *Proteomics*. 3: 363-379.

- Vitousek, P. M., H. A. Mooney, J. Lubchenco y J. M. Melillo. 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science*. 277 (5325): 494-499.
- Watkinson, I. 1994. Global view and future markets for *Bt* products. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 49 (1): 3-7.
- Wei, J. Z., K. Hale, L. Carta. E. Platzer, C. Wong, S. C. Fand y R. Aroian. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*. 100 (5): 2760-2765.
- Western, D. 2001. Human-modified ecosystems and future evolution. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 98 (10): 5458-5465.
- Whalon, M. E. y B. A. Wingerd. 2003. *Bt*: Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 54 (4): 200-211.
- Whalon, M., D. Mota-Sanchez y R. M. Hollingworth. 2007. Global data base for insect resistance. *Entomological Research*. 37 (Suplemento 1): A59-A60.
- Williamson, S. 1998. Understanding natural enemies; a review of training and information in the practical use of biological control. *Biocontrol News and Information*. 19 (4): 117N-126N.
- Wu, K., Y. Guo, N. Lv, J. T. Greenplate y R. Deaton. 2003. Efficacy of transgenic cotton containing a *cry1Ac* gene from *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *Journal of Economic Entomology*. 96 (4): 1322-1328.
- Yamamoto, T. y D. H. Dean. 2000. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. En: *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. J. F. Charles, A. Lerécluse y C. Nielsen-Le Roux (Eds.). 81-100 pp.
- Yu, C.-G., M. A. Mullins, G. W. Warren, M. G. Koziel y J. J. Estruch. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein VIP3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (2): 532-536.
- Zaim, M. y P. Guillet. 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *TRENDS in Parasitology*. 18 (4): 161-163.
- Zehnder, G., G. M. Gurr, S. Kühne, M. R. Wade, S. D. Wratten y E. Wyss. 2007. Arthropod pest management in organic crops. 2007. *Annual Review of Entomology*. 52: 57-80.
- Zhao, J. Z., J. Cao, H. L. Collins, S. L. Bates. R. T. Roush, E. L. Earle, y A. M. Shelton. 2005. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided

plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 102 (24): 8426-8430.

Zhu, X., R. R. McVei hg, P. Malathi y B. K. Gosh. 1996. The complete nucleotide sequence of the *Bacillus licheniformis* NM105 S-layer encoding gene. Gene. 173: 189-194.