

TESIS DOCTORAL

Maria Cristina Crava

2013

Estudio de las bases de la resistencia
a las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*
en *Ostrinia nubilalis*



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Directores:

Dr. Baltasar Escriche Soler

Profesor Titular de la Universidad
Departamento de Genética
ERI de Biotecnología y Biomedicina
Universitat de València

Dra. Yolanda Bel Cortés

Doctora en Biología
Departamento de Genética
ERI de Biotecnología y Biomedicina
Universitat de València

Dr. D. Baltasar Escriche Soler, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, y

Dra. Dña. Yolanda Bel Cortés, Investigadora contratada, ERI de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad de Valencia,

INFORMAN:

Que Dña. Maria Cristina Crava, Licenciada en Biotecnología, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria que lleva por título: "**Estudio de las bases de la resistencia a las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en *Ostrinia nubilalis***".

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman la presente en Burjassot, a 15 de enero de 2013.

Director: Dr. D Baltasar Escriche Soler

Directora: Dra. Dña. Yolanda Bel Cortés

AGRADECIMIENTOS

Tantas personas y tantos momentos (y tantos abrazos) hacen parte del resultado final que es esta tesis. A todos los que me han acompañado (aunque durante un tiempo limitado), gracias por animarme, incentivar-me, empujarme a seguir adelante por este camino tan difícil, tan lejos de mi casa pero por otro lado tan cerca, ya que Valencia querida se ha convertido en el hogar de mi corazón.

Gracias a Baltasar por acogerme bajo su dirección y por creer en mi, gracias por las discusiones y las broncas, por estos cinco años felices y productivos, por su "pesimismo crónico" (y su optimismo escondido) y por sus lecciones de historia y de geografía.

Gracias a Yolanda por ser algo más que una directora de tesis y una compañera de laboratorio, por parecerse a alguien de tu familia que te conoce desde que naciste, por entenderse conmigo desde el primer momento a pesar del idioma, por representar un modelo a seguir de la mujer que me gustaría llegar a ser algún día.

Gracias a Patricia y a Gloria, por haber sido dos amigas desde el día en que empecé. La primera por ser mi hermana científica mayor, por las charlas en las tardes antes de volver a casa, por los consejos, las sonrisas y las buenas palabras que nunca le faltan. A la segunda por haber compartido conmigo el camino de la tesis casi enteramente, por haberme enseñado, ayudado, aconsejado, ya que el hecho de haber empezado un poco antes hizo que se enfrentara la primera a todos los problemas y los obstáculos.

Gracias a Juan por su buen humor, las fiestas en la piscina, las cenas de Navidad para extranjeros, por creer en las personas como seres humanos y por su grandísima competencia científica.

Gracias a Salva y Agata, por su amistad dentro y fuera de lab. Gracias por sus genialidades y locuras, por ir a la Tomatina sin ver tomates, las cervecitas del jueves, las barbacoas de despedida, los viajes a la montaña para esquiar. Gracias al primero por haberme aguantado y escuchado, por los consejos, las conversaciones científicas y escatológicas y por haber peleado conmigo aquella vez, que igual tenías tu la razón pero no te lo repetiré nunca más! Gracias a Agata por ser la vecina que todos quisieran, por formar parte de mi familia reducida y por integrarnos en la suya, por las cervezas argentinas y su obsesión con el tango, por todos los viajes de descubrimiento de las sierras españolas.

Gracias a mi Nurieta bella, que desde su llegada al lab se ha convertido en la alegría de mi corazón! Por sus ganas de reír y hablar, por estar siempre disponible, por la fideuà de Xavi que sabemos todos que está mejor que la de su mamá (¿¿¿??), por los conciertos, las charlas nocturnas pamplonesas, la Golfa y el estímulo que me da para seguir yendo a la piscina!

Gracias a todos los integrantes de este gran grupo/familia que es GBQBT. A Maissa y a su risa de corazón, a su paciencia y determinación A Rosi por su ayuda en el lab y su capacidad de ser siempre de buen humor. A Leila por su amabilidad y su sonrisa constante. A María, mi grande-pequeña colaboradora, por su alegría y por ser siempre tan gentil y disponible. A Natalia, la última llegada y mi mejor enemiga, gracias por dar cuerda a mis bromas: no te lo volveré a decir nunca, pero me caes muy bien!

Gracias a l@s visitantes que han dejado una huella en mi corazón y que con su amistad siempre presente desde la lejanía mucho me han ayudado: a mí querida nippo-brasileña Marise, a Mariano y a la parejita Camila y Caio. Gracias a las ex-componentes de nuestro grupo: a Sara, a mi compatriota Silvia, a Anabel y a la mejor cocinera de tartas del mundo, Manoli.

Gracias a los compañeros del departamento de Genética, por la muchas veces que me han ayudado y las muchas risas que me han dado durante estos años. En particular gracias a Bea, Ivan, Juanma y Camila por el tiempo compartido fuera del lab. Gracias a los participantes de aquél famoso viaje multi-lab a Granada y a Córdoba. Nunca nadie hubiera podido pensar que resultase tan entretenido como salió!

Gracias a Juan Luis por haberme dado la posibilidad de realizar una estancia "al otro lado del charco" y aprender cosas nuevas, científicamente y humanamente. Gracias por el cariño con el cual me acogiste y por tener siempre una sonrisa en los labios.

Gracias a mi papá por haber creído siempre en mí y por empujarme "a apuntar en alto", por enseñarme que uno se puede superar constantemente, por quererme con locura y por no haberme reñido nunca diciéndome "Estudia!".

En fin, gracias a Oscar, mi amor. Te encontré durante este largo camino y convertiste en mucho más livianas las partes más difíciles. Gracias por caminar a mi lado, espero que esta sea la primera etapa de un largo viaje junto.

Il primo passo di ogni grande sapere è il sapere di non sapere

-- **Tiziano Terzani**

*A mi papá Giancarlo y a mi mamá Giovanna,
por haberme hecho tan inquieta*

RESUMEN/ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	11
1.1 GENERALIDADES DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
1.1.1 Situación taxonómica y morfología.....	13
1.1.2 Identificación y clasificación	14
1.2 LAS TOXINAS DE <i>B. thuringiensis</i>	15
1.2.1 β -exotoxinas.....	15
1.2.2 Enterotoxinas, hemolisinas y exoenzimas	16
1.2.3 Proteínas Vip.....	16
1.2.4 δ -endotoxinas	17
1.2.4.1 <i>Proteínas Cyt</i>	19
1.2.4.2 <i>Proteínas Cry</i>	21
1.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Cry	26
1.3.1 Solubilización, activación y unión al receptor primario	26
1.3.1.1 <i>Caderina</i>	29
1.3.1.2 <i>Aminopeptidasas N (APN)</i>	30
1.3.1.3 <i>Fosfatasa alcalina (ALP)</i>	31
1.3.1.4 <i>Otros "receptores" candidatos</i>	31
1.3.2 Modelo de la formación de poro	31
1.3.3 Modelo de la cascada de señales	33
1.4 APLICACIONES DE <i>B. thuringiensis</i>	34
1.4.1 Formulados insecticidas.....	34
1.4.2 Plantas transgénicas Bt	35
1.5 RESISTENCIA A LAS PROTEÍNAS Cry	38
1.5.1 Generalidades.....	38
1.5.2 Bases genéticas de la resistencia	39
1.5.2.1 <i>Identificación de los genes de resistencia</i>	44

1.5.3 Mecanismos de resistencia.....	46
1.5.3.1 Modificación de los sitios de unión de las proteínas Cry a la membrana epitelial.....	47
1.5.3.2 Alteración del procesado proteolítico.....	49
1.5.3.3 Otros mecanismos.....	49
1.5.3.4 Mecanismos múltiples de resistencia.....	50
1.5.4 Manejo de la resistencia.....	50
1.6 <i>Ostrinia nubilalis</i> (HÜBNER, 1796).....	52
1.6.1 Distribución y biología.....	52
1.6.2 Control en el campo.....	54
1.6.3 Toxicidad de las proteínas insecticidas de <i>B. thuringiensis</i>	54
1.6.4 El maíz Bt en el control de <i>O. nubilalis</i>	55
OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1 COLONIAS DE <i>O. nubilalis</i>	65
3.1.1 Origen.....	65
3.1.2 Mantenimiento.....	66
3.2 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Cry.....	68
3.2.1 Obtención de las proteínas Cry a partir de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	68
3.2.2 Obtención de las proteínas Cry a partir de <i>E. coli</i>	69
3.2.3 Purificación cromatográfica de las proteínas Cry.....	71
3.3 ENSAYOS DE MORTALIDAD.....	72
3.3.1 Ensayos con toxinas purificadas.....	72
3.3.2 Ensayos con el producto estándar HD-1-S-2005.....	73
3.3.3 Ensayos de mortalidad funcional.....	73
3.3.4 Ensayo de selección.....	74
3.4 ANÁLISIS GENÉTICO CUANTITATIVO DE LA TOLERANCIA A LA PROTEÍNA Cry1Ab.....	75

3.5 PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA	78
3.6 MARCAJE DE LAS PROTEÍNAS Cry CON BIOTINA.....	79
3.7 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	80
3.7.1 Electrotransferencia de proteínas	80
3.7.2 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana de nitrocelulosa .	80
3.7.2.1 <i>Inmunodetección de proteínas marcadas con biotina</i>	80
3.7.2.2 <i>Inmunodetección de proteínas con cola de histidina</i>	81
3.7.2.3 <i>Inmunodetección de la caderina</i>	81
3.7.2.4 <i>Inmunodetección de las proteínas Cry1Ab y Cry1F</i>	81
3.7.2.5 <i>Inmunodetección de la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F</i>	82
3.8 ENSAYO DE UNIÓN DE LA PROTEINA Cry1Ab BIOTINILADA A BBMV DE <i>O. nubilalis</i>	82
3.9 ENSAYOS DE BLOQUEO DE LA UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS Cry1Ab Y Cry1F A BBMV DE <i>O. nubilalis</i>	83
3.9.1 Bloqueo de la unión con proteínas Cry.....	83
3.9.2 Bloqueo de la unión con lectinas.....	84
3.9.3 Bloqueo de la unión con azúcares	84
3.9.4 Bloqueo de la unión con anticuerpo anticaderina.....	84
3.10 PREPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	85
3.10.1 Extracción de ADN genómico	85
3.10.2 Extracción de ARN total.....	85
3.11 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	86
3.11.1 Amplificaciones mediante PCR	86
3.11.2 Polimorfismo de longitud de secuencia de intrones	87
3.11.3 Detección de transcritos.....	87
3.11.4 Amplificación Rápida de Extremos de ADNc (RACE-PCR)	88
3.11.5 Análisis cuantitativo de transcritos por PCR a tiempo real (RT-qPCR)..	89
3.12 CLONACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN	90

3.12.1 Metodología general.....	90
3.12.2 Clonación de los productos de PCR.....	90
3.12.3 Clonación de las <i>On</i> APNs en el vector pFBΔ_GFP_phX para su expresión en células de insecto.....	91
3.12.4 Clonación de fragmentos de ADN en el vector pL4440 para la producción de ARN de doble cadena (ARNcd).....	93
3.12.5 Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas para clonación y expresión.....	94
3.12.6 Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	95
3.12.7 Electrotransformación de <i>E. coli</i>	96
3.13 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN EL SISTEMA DE BACULOVIRUS (Bac-to-Bac®).....	96
3.14 ENSAYOS DE ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.....	99
3.15 ENSAYOS DE INMUNOTINCIÓN.....	100
3.16 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	101
3.17 SILENCIAMIENTO DE LAS <i>On</i> APNs MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA (ARNi).....	101
3.17.1 Preparación de ARNcd.....	101
3.17.2 Suministro de ARNcd.....	104
3.18 PROGRAMAS BIOINFORMATICOS Y BASES DE DATOS.....	106
RESULTADOS	109
4.1 ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE RESISTENCIA A LAS PROTEÍNAS Cry EN <i>O. nubilalis</i>	111
4.1.1 Análisis de la susceptibilidad basal de una colonia de campo.....	111
4.1.1.1 <i>Ensayos de mortalidad</i>	111
4.1.1.2 <i>Ensayos de mortalidad funcional</i>	114
4.1.2 Ensayo de selección con la proteína Cry1Ab en una colonia de campo..	115
4.1.3 Análisis genético cuantitativo de la tolerancia a la proteína Cry1Ab.....	118
4.1.3.1 <i>Segregación de los alelos del gen <i>cdh</i> en las isolíneas <i>I_T</i></i>	121

4.1.3.2 Caracterización de la secuencia del gen <i>cdh</i> en la zona descrita de unión a las toxinas Cry.....	124
4.2 INTERACCIÓN DE LAS TOXINAS Cry CON PROTEÍNAS DEL EPITELIO INTESTINAL DE <i>O. nubilalis</i>	125
4.2.1 Estudio de la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F a BBMV de <i>O. nubilalis</i>	125
4.2.2 Identificación de las proteínas del epitelio intestinal de <i>O. nubilalis</i> que unen a las toxinas Cry1Ab y Cry1F	128
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS AMINOPEPTIDASAS DE <i>O. nubilalis</i>	133
4.3.1 Aislamiento y caracterización de las secuencias codificantes.....	133
4.3.2 Análisis filogenético.....	136
4.3.3 Identificación y caracterización <i>in silico</i> de los genes ortólogos a las aminopeptidasas de <i>O. nubilalis</i> en el genoma de <i>B. mori</i>	138
4.3.4 Patrón de expresión de los genes <i>onapn</i> y <i>onpsa</i>	142
4.3.5 Expresión heteróloga de las <i>onAPN</i> en células Sf21.....	144
4.3.6 Caracterización de la actividad aminopeptidásica.....	146
4.3.6.1. Especificidad de sustrato.....	146
4.3.6.2 Sensibilidad a inhibidores.....	147
4.4 INTERACCIÓN DE LAS <i>OnAPN</i> CON LAS PROTEÍNAS Cry.....	149
4.4.1 Ensayos de unión de las proteínas Cry	149
4.4.2 Ensayos de citotoxicidad con las proteínas Cry.....	152
4.5 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE <i>onapn1</i> Y <i>onapn2</i> MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA.....	154
DISCUSIÓN	159
5.1 ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE RESISTENCIA A LAS PROTEÍNAS Cry EN <i>O. nubilalis</i>	161
5.1.1 Análisis de la susceptibilidad basal de una colonia de campo y selección de resistencia a la proteína CryAb	161
5.1.2 Análisis genético cuantitativo de la tolerancia a la proteína Cry1Ab.....	166

5.2 INTERACCIÓN DE LAS TOXINAS Cry CON PROTEÍNAS DEL EPITELIO INTESTINAL DE <i>O. nubilalis</i>	171
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS APN DE <i>O. nubilalis</i> E INTERACCIÓN CON LAS PROTEÍNAS Cry.....	175
CONCLUSIONS	191
BIBLIOGRAFÍA	195
ANEXOS	235

Abreviaturas

°C: grados centígrados (Celsius);

aa: aminoácido/s;

AcMNPV: Nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica*, del inglés *A. californica* multiple nucleopolyhedrovirus;

ADN: ácido desoxirribonucleico;

ADNc: ADN complementario;

AMPc: adenosín monofosfato cíclico, del inglés adenosine monophosphate;

ARN: ácido ribonucleico;

ARNm: ARN mensajero;

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

CF₅₀: concentración que mata y/o inhibe el crecimiento del 50% de la población;

CL₅₀: concentración que mata al 50% de la población;

CT: ciclo umbral, del inglés cycle treshold;

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, del inglés 4',6-diamidino-2-phenylindole;

DNasa I: desoxirribonucleasa I;

dNTP : desoxirribonucleótido trifosfato, del inglés deoxyribonucleotide triphosphate;

DTT: ditiotreitól;

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético, del inglés ethylene diamine tetraacetic acid;

EGTA: ácido etilenglicol tetraacético, del inglés ethylene glycol tetraacetic acid;

ELISA: ensayo por inmunoabsorción mediado por enzimas, del inglés enzyme-linked immunosorbent assay;

FPLC: cromatografía líquida rápida para separación de proteínas, del inglés fast protein liquid chromatography;

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

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido;

gl: grados de libertad;

kDa: kiloDalton;

kpb: kilopares de bases;

O/N: por la noche, del inglés overnight;

ORF: pauta abierta de lectura, del inglés open reading frame;

p/v: peso/volumen;

pb: pares de bases;

PBS: tampón fosfato salino (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4), del inglés phosphate buffered saline;

PFA: paraformaldeído;

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo, del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride;

Rep-PCR: amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos, del inglés repetitive extragenic palindromic-PCR;

RNasa III: ribonucleasa III;

RNasa A: ribonucleasa A;

rpm: revoluciones por minuto;

SE: error estándar de la media, del inglés standard error of the mean;

SD: desviación estándar, del inglés standard deviation;

SDS: dodecil sulfato sódico, del inglés sodium dodecyl sulfate;

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

siRNA: ARN de interferencia pequeño, del inglés short interference RNA;

SPR: resonancia de plasmón superficial, del inglés surface plasmon resonance;

TA: temperatura ambiente;

T_m: temperatura de fusión, del inglés melting temperature;

Tris: tris (hidroximetil) aminometano;

UV: ultravioleta;

v/v: volumen/volumen;

x g: fuerza centrífuga relativa;

XGal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido.

RESUMEN/ABSTRACT

Ostrinia nubilalis (Hübner) es una de las plagas más devastadoras de los cultivos de maíz de Europa y Norte América, y a nivel económico la obtención de un control eficaz de esta plaga es un logro fundamental. En 1996, se permitió la comercialización de las plantas transgénicas que llevan insertado en el genoma un gen procedente de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) y que codifica para una proteína insecticida de las que esta bacteria produce en forma de cristales paraesporales (proteínas Cry). A partir de esta fecha, la adopción de los cultivos de maíz Bt que expresan en concreto la toxina Cry1Ab ha ido aumentando progresivamente en todo el mundo, con el resultado de que las pérdidas económicas producidas por *O. nubilalis* se han reducido de forma considerable. Recientemente, un nuevo evento de maíz transgénico que expresa la proteína Cry1F, también tóxica frente *O. nubilalis*, ha salido a la venta, aumentando el abanico de plantas Bt empleadas para el control de esta plaga. Las ventajas derivadas del empleo de las plantas Bt son muchas pero esta tecnología no está libre de amenazas: el mayor peligro reside en el potencial de los insectos diana para desarrollar resistencia a las toxinas insecticidas empleadas contra ellos. La posible aparición de resistencia se puede producir por mutaciones en cualquiera de los genes involucrados en cada uno de los pasos del mecanismo de acción de las proteínas Cry. Por esta razón, el conocimiento de las bases bioquímicas por las cuales actúan estas toxinas, así como de las bases genéticas, son esenciales para preservar a largo plazo las tecnologías fundamentadas en *B. thuringiensis*.

Para la realización de este trabajo de investigación se planteó abordar tanto la caracterización de poblaciones españolas de *O. nubilalis*, estudiando el potencial de desarrollo de resistencia a la toxina Cry1Ab, como el estudio de las moléculas del epitelio intestinal que pueden estar implicadas en el mecanismo de toxicidad de las proteínas Cry en este insecto plaga.

En la primera parte de esta tesis, comparamos la susceptibilidad de una población de campo procedente del sur-este de España con la de una colonia de laboratorio a cuatro proteínas Cry ensayadas tanto en forma de toxina activada como de protoxina, así como al producto estándar HD-1-S2005. La característica principal de la población de campo escogida fue su procedencia: invernaderos cultivados con pimientos, donde se utilizaban formulados Bt para el control de las plagas de lepidópteros durante toda la temporada vegetativa. Los resultados de los bioensayos de mortalidad indicaron que las proteínas más tóxicas para *O. nubilalis* son las toxinas de la clase 1 mientras que la toxina Cry2Aa ejerce un efecto tóxico menor. Con este tipo de ensayos, encontramos diferencias significativas entre la

susceptibilidad de la colonia de campo y de la colonia de laboratorio, siendo esta última más susceptible a todas las toxinas de la clase 1. Sin embargo, el conjunto de todos los resultados obtenidos en este trabajo, que incluyen también el estudio de la mortalidad funcional y un ensayo de selección en laboratorio de resistencia a la proteína Cry1Ab, apunta a que las diferencias encontradas se debían más probablemente a variación intraespecífica que a un proceso de selección de resistencia producido en el invernadero.

En el segundo apartado de esta tesis, la tolerancia de *O. nubilalis* a la proteína Cry1Ab se estudió bajo un punto de vista genético cuantitativo. Se fundaron isolíneas derivadas del apareamiento de adultos procedentes de dos diferentes localidades españolas, y las progenies se sometieron a cribado con la proteína Cry1Ab, a una concentración que causó una mortalidad media entre todas las isolíneas del 87% ($\pm 17\%$ SD). Solamente aquellos individuos que pertenecían a las isolíneas que tuvieron una supervivencia mayor del 40% se utilizaron para obtener la generación siguiente, que se sometió a cribado con la misma concentración de proteína Cry1Ab. Pudimos observar una clara reducción en la mortalidad, ya que la mortalidad media entre todas las isolíneas en la generación F₂ fue de 62% ($\pm 17\%$ SD). El límite superior para la heredabilidad (h^2) de la tolerancia a la proteína Cry1Ab se calculó mediante dos métodos y se situó entre 0.82 y 0.90, indicando que buena parte de la variación fenotípica en la tolerancia a la proteína Cry1Ab dependía de diferencias genéticas. La aplicación de la ecuación de Lande confirmó que la tolerancia a Cry1Ab tenía una base poligénica, ya que era debida a, como mínimo, dos *loci*. La contribución del gen de la caderina (candidato por estar ligado a la resistencia en otros lepidópteros) a la tolerancia a la proteína Cry1Ab se comprobó utilizando marcadores moleculares EPIC-PCR; el estudio de la segregación alélica en las isolíneas más tolerantes indicó su posible contribución en una de las cinco isolíneas examinadas.

La unión de las proteínas Cry al epitelio intestinal de lepidópteros como *O. nubilalis* es un mecanismo fundamental para la toxicidad. Abordamos el estudio de las diferencias entre la unión de dos proteínas de la clase 1 (Cry1Ab y Cry1F), ambas expresadas en el maíz transgénico resistente a *O. nubilalis*, mediante ensayos de preincubación del epitelio intestinal con las mismas toxinas, lectinas, y anticuerpo anticaderina. La unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F (marcadas con biotina) resultó verse afectada de forma diferente: mientras que ningún tipo de preincubación pareció afectar la unión de la toxina Cry1Ab, la unión de la toxina Cry1F disminuyó tras preincubación con las toxinas Cry1Ab y Cry1F sin marcar y

con el ácido sálico. Estas diferencias apuntan a la existencia de diferentes receptores (además de unos compartidos) para estas dos toxinas. Ensayos de inmunodetección de la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F indicaron que éstas unen a proteínas del epitelio intestinal de *O. nubilalis* de un tamaño de 150 y 75 kDa, y que solamente Cry1Ab une a una proteína de alrededor de 250 kDa. Mientras que no obtuvimos ningún resultado en la identificación de las proteínas que componían la banda de 250 kDa, las proteínas más abundantes que componían las dos bandas de 75 y 150 kDa fueron identificadas como varias isoformas de aminopeptidasas N (APN). Estas son enzimas intestinales propuestos como receptores para la unión de las proteínas Cry al epitelio intestinal en varios lepidópteros.

Finalmente, las APN expresadas en el intestino de *O. nubilalis* se caracterizaron a nivel genético, funcional y en lo que respecta a su interacción con las proteínas Cry1Ab y Cry1F. Las secuencias codificantes para seis isoformas de APN más una aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) se clonaron a partir de ADNc de intestino, y se caracterizaron buscando la presencia de motivos funcionales y analizando sus relaciones filogenéticas. El patrón de expresión espacial y temporal indicó que todos los genes están expresados en el intestino de las larvas de *O. nubilalis* durante todo el desarrollo larvario, y que solo un transcrito (*onapn8*) está expresado también en los túbulos de Malpighio. El gen *psa* es el único en tener una expresión ubicua en todos los tejidos analizados. Cinco APN se expresaron con éxito en las células Sf21 utilizando el sistema Bac-to-Bac® basado en baculovirus. La caracterización de la actividad enzimática de cada isoforma expresada en las células Sf21 demostró que cada una de ellas es funcionalmente diferente, tanto en la afinidad a varios sustratos como por la sensibilidad a diferentes inhibidores. La interacción de las APN expresadas *ex vivo* con las proteínas Cry se abordó mediante ensayos de inmunohistoquímica. Este tipo de aproximación nos permitió visualizar la interacción diferencial de las APN con las toxinas Cry1Ab y Cry1F: la isoforma *OnAPN1* es capaz de unir a ambas toxinas mientras que las isoformas *OnAPN3a* y *OnAPN8* solamente unen a Cry1F.

Como conclusión, este trabajo aporta resultados que se añaden a los publicados previamente y que son necesarios para evaluar el potencial de desarrollo de resistencia a las proteínas Cry en *O. nubilalis*. En primer lugar, la tolerancia a las proteínas Cry1Ab parece ser un rasgo común en poblaciones de campo españolas. En segundo lugar, este rasgo parece derivar del efecto conjunto de varios genes, según hemos concluido tras realizar estudios de genética cuantitativa con isolíneas

fundadas con individuos de zonas geográficamente distantes de España. Adicionalmente, se ha analizado la interacción de las proteínas Cry1Ab y Cry1F con el epitelio intestinal de *O. nubilalis*, encontrando diferencias de especificidad en la unión de estas proteínas e identificando a las APN como posibles receptores. Se han caracterizado las secuencias de los transcritos de seis isoformas de APN, y cinco han sido expresados en cultivo celular para determinar su actividad biológica y su interacción con las proteínas Cry. Los resultados indican que, de las APN estudiadas, las que podrían jugar un papel en la unión de las proteínas Cry al epitelio intestinal son tres. Además, según hemos evidenciado, estas proteínas parecen interactuar de forma diferencial con las toxinas Cry1Ab y Cry1F. Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis complementan los datos existentes en la literatura y esencialmente son útiles para el diseño de estrategias eficaces de manejo de la resistencia a las tecnologías Bt utilizadas a día de hoy en el control de *O. nubilalis*.

Ostrinia nubilalis (Hübner) is one of the key pests of maize cultivations both in Europe and North America. Its effective control is one of the most important goals of the pest management, since this lepidopteran species causes economically relevant losses. Commercialization of transgenic plants expressing insecticidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) started in 1996 and since then cultivation of Bt maize expressing Cry1Ab has been steadily increasing, reaching an effective control of *O. nubilalis*. Recently, a second Bt maize event expressing Cry1F has been commercialized. The effectiveness of the technologies based on Bt is seriously threatened by the possible development of the resistance in the target insects. Resistance may be caused by mutations that occur in one of the multiple steps of the mode of action of the Cry toxins in Lepidoptera. The knowledge of the biochemical basis that undergones the toxicity process produced by the Cry proteins, as well as the genetics of the resistance, are fundamental to design strategies aimed to preserve the efficacy of the Bt technologies as long as possible.

The work presented here had two main objectives: first, the evaluation of the potential in Spanish populations of *O. nubilalis* to develop resistance to Cry toxins; second, the characterization of the Cry1Ab and Cry1F interactions with the midgut epithelium of *O. nubilalis*. To these purposes, we analyzed the susceptibility of a greenhouse population collected from cultivations regularly sprayed with Bt formulations. Also, we applied quantitative genetic techniques to investigate the tolerance to Cry1Ab in field populations and we developed a molecular marker to assess the contribution of the candidate resistance gene *cadherin* to the tolerance. Moreover, we characterized the *O. nubilalis* aminopeptidases (APNs) that have been previously described as candidate receptor for Cry proteins.

The baseline susceptibility of the Spanish greenhouse population of *O. nubilalis* to four individual Cry protoxins, activated toxins and to the standard product HD-1-S-2005, was compared with the one obtained for a laboratory strain never exposed to *B. thuringiensis*. The greenhouse population was sampled from greenhouses routinely sprayed with Bt products during the whole growing season, to control lepidopteran pest infestations. Results from mortality assays indicated that toxins from class Cry1 are the most effective against *O. nubilalis* while Cry2Aa exerts a minor toxic effect. We found significant differences in susceptibility between the greenhouse and the laboratory strains to all the individual Cry1 protoxins and toxins tested. However, the overall results that included functional mortality bioassays and laboratory resistance selection with Cry1Ab protein,

suggested that the susceptibility differences probably reflected intraspecific variation instead to be due to a selection process occurred in the greenhouse.

Tolerance to Cry1Ab protein in Spanish *O. nubilalis* populations was studied as a quantitative genetic trait, using isolines established from field-derived insects. F₁ offspring was tested for susceptibility to trypsin-activated Cry1Ab using a concentration that caused a mean larval mortality of 87% (\pm 17% SD). The progeny of the most tolerant isolines (that had shown mortalities lower than 60%) was crossed to obtain the F₂ generation that was exposed to the same Cry1Ab concentration. A clear reduction in mortality (62% \pm 17% SD) was observed. The upper limit for heritability was estimated to range between 0.82 and 0.90, suggesting that a high part of phenotypic variation in tolerance to Cry1Ab was attributable to genetic differences. An estimate of the minimum number of segregating factors indicated that the *loci* involved in tolerance to Cry1Ab were at least two. The role of the *cadherin*, which is a *B. thuringiensis* resistance gene in some lepidopteran species, was assessed in the most tolerant isolines by using an EPIC-PCR marker specifically developed for this study. Association between *cadherin* and tolerance was obtained in one tolerant isolate; however it could be not confirmed by segregation analysis in the F₂ progeny because F₂ offspring was not viable. Our results indicate that the tolerance trait is common in Spanish field populations of *O. nubilalis*.

Binding of Cry proteins to the midgut epithelium of susceptible lepidopteran larvae is an essential step in the toxicity process. We try to discriminate the interaction of two Cry proteins from class 1 (Cry1Ab and Cry1F), both of them nowadays expressed in the transgenic Bt maize, to the *O. nubilalis* midgut epithelium. We assayed the effect of preincubations of the component of the binding assays (biotinilated toxins or brush border membrane vesicles) with Cry1Ab or Cry1F toxins, sugars, lectins or anticadherin antibody. Results showed that Cry1Ab protein bind to BBMV in a different way than Cry1F: binding signal of Cry1Ab did not decrease after any preincubation while Cry1F binding signal decreased after preincubations with Cry1F, Cry1Ab and sialic acid. These differences pointed out the existence of a midgut receptor not shared by the two Cry proteins, in addition to one or more common receptors. Ligand blot assays showed that Cry1Ab and Cry1F toxins bind to 75 and 150 kDa proteins from midgut epithelium. Cry1Ab toxin also binds to a band of 250 kDa. Identification of the protein present in the 250 kDa band did not render any result, whereas the most abundant proteins composing bands of 75 and 150 kDa were identified as

aminopeptidasas N (APNs). These proteins are midgut enzymes that had been previously described as candidate receptor for Cry proteins in several lepidopteran species.

APNs from *O. nubilalis* midgut were sequenced, characterized for functional motifs and expression pattern, and expressed *ex vivo* to evaluate their biological activity and their interaction with Cry1Ab and Cry1F proteins. In this work, seven transcripts expressed in *O. nubilalis* midgut and codifying for aminopeptidases were sequenced. Six out the seven sequences analyzed were classified as *OnAPN* while one sequence was identified as puromycin-sensible aminopeptidase (*OnPSA*). Expression of all the transcripts was steadily detected in the midgut of the larvae throughout the whole larval stage. However, only one *OnAPN* transcript (*onapn8*) was expressed also in Malpighian tubules whereas *onpsa* gen showed a ubiquitous expression. Five *OnAPN* were successfully expressed as recombinant proteins in Sf21 cells using the Bac-to-Bac® system. Characterization of the enzymatic activity displayed differences among the cell-expressed *OnAPNs* in substrate affinity and sensitivity to inhibitors. Interaction of the cell-expressed *OnAPNs* with the Cry1Ab and Cry1F proteins was assessed by using fluorescent antibodies. The results showed differential binding specificity of Cry proteins to the *OnAPN* isoforms: *OnAPN1* binds to both Cry1Ab and Cry1F toxins while *OnAPN3a* and *OnAPN8* only bind to Cry1F protein.

In summary, this work provides data on the susceptibility and the potential for resistance appearance to Bt products in *O. nubilalis* populations. Also, data presented here are useful to understand the mode of action of two Cry proteins, Cry1Ab and Cry1F, nowadays expressed in Bt maize resistant to *O. nubilalis* attacks. This information complement data reported in literature, helping to design effective resistance management strategies for the Bt technologies used in the *O. nubilalis* control.



INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE *Bacillus thuringiensis*

Las propiedades insecticidas de *B. thuringiensis* fueron descritas por primera vez en 1901 por el biólogo japonés Ishiwatari el cual aisló esta bacteria durante un estudio sobre la enfermedad llamada "del sotto" que provocaba la muerte del gusano de seda, *Bombyx mori*. Diez años más tarde, la misma bacteria fue aislada en Alemania por Berliner, que estaba estudiando una enfermedad del lepidóptero *Ephestia kuehniella* y la llamó *B. thuringiensis*, por la provincia alemana en la que ocurrió el descubrimiento. Durante los años veinte, se llevaron a cabo experimentos para estudiar el potencial de *B. thuringiensis* como insecticida y los resultados, prometedores (Husz, 1930), llevaron al desarrollo del primer producto comercial que fue puesto a la venta en Francia en 1938. Hoy en día, *B. thuringiensis* es el bioinsecticida más empleado a nivel mundial (Sanchis y Bourguet, 2009) y sigue ofreciendo nuevas expectativas por el empleo de sus proteínas insecticidas en la producción de plantas transgénicas resistentes a los insectos plagas.

1.1.1 Situación taxonómica y morfología

B. thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva que tiene la característica de formar esporas durante la fase estacionaria de su ciclo de vida (Figura 1A). Es ubicua y puede encontrarse de forma normal en el suelo así como en agua, hojas de plantas, grano almacenado y en insectos muertos (Schnepf *et al.*, 1998). Pertenece al género *Bacillus* y forma parte del grupo *Bacillus cereus* que se compone de los siguientes miembros: *B. thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* y *Bacillus weihenstephanensis*. Numerosos estudios han mostrado la estrecha relación a nivel genético que une *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis*, hasta el punto que se ha sugerido el incluirlas todas dentro de una misma especie, *B. cereus sensu lato* (Helgason *et al.*, 2000; Rasko *et al.*, 2005). Tradicionalmente, la separación de estos organismos se ha realizado en base a características fenotípicas, en particular según el potencial patogénico de cada especie (Rasko *et al.*, 2005). Muchos estudios se han llevado a cabo con diferentes técnicas moleculares para poder diferenciar genéticamente estas especies, entre ellas la hibridación ADN-ADN, la comparación de los ARN ribosomales 16S y 23S o de su región espaciadora y la utilización de marcadores moleculares o MLST (del inglés multilocus sequence typing) (ver Rasko *et al.*, 2005; Maughan y Van der Auwera, 2011 para una revisión completa). Mientras que una mutación en el gen *plcr* ha podido clasificar *B. anthracis* como una especie aparte (Kolstø *et al.*, 2009), los resultados de los estudios genómicos

han descartado la idea de que *B. cereus* y *B. thuringiensis* sean dos especies genéticamente distintas. A pesar de ser fenotípicamente polimórficas, la variación existente entre las dos especies, comparada con la variación dentro de cada especie es tal que ninguna de las dos puede mostrar una identidad genómica individual, excepto por las propiedades de los plásmidos que contienen (Maughan y Van der Auwera, 2011). Los plásmidos de *B. thuringiensis* generalmente tienen la característica de codificar para proteínas que forman cristales tóxicos para insectos y que son producidos durante la esporulación (como ejemplo ver Figura 1B). Estas inclusiones cristalinas están compuestas por una o más proteínas normalmente denominadas δ -endotoxinas. La forma del cristal paraesporal de *B. thuringiensis* varía en función de las proteínas que lo componen pudiéndose observar cristales bipiramidales, cúbicos, esféricos, irregulares, rectangulares, romboidales y triangulares. Los tamaños de los cristales pueden oscilar entre los 350 nm de diámetro en algunos cristales irregulares a los 2 μ m de longitud de muchos cristales bipiramidales.

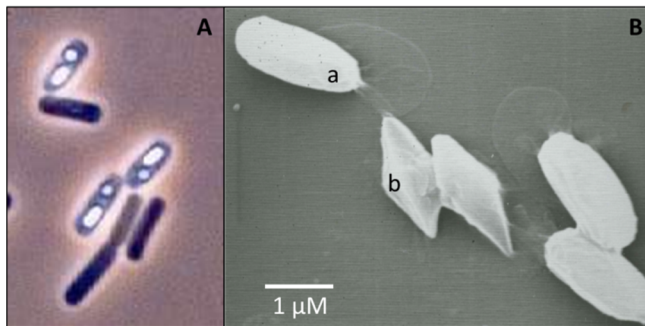


Figura 1: A) Cultivo de *B. thuringiensis*; B) Micrografía electrónica de barrido que muestra esporas (a) y cristales (b) de *B. thuringiensis*.

1.1.2 Identificación y clasificación

La producción de los cristales paraesporales es la característica fenotípica que diferencia mayormente *B. thuringiensis* de *B. cereus*. Originariamente, se intentó poner a punto un método de clasificación basado en la morfología del cristal para distinguir entre subespecies de *B. thuringiensis* (Sthaly *et al.*, 1978). Sin embargo, la gran variedad de los genes codificantes para las δ -endotoxinas que componen dichos cristales y la evidencia de la presencia de múltiple genes en una sola cepa han hecho prácticamente imposible los intentos de clasificación basados en la forma del cristal y en la patogenicidad. Además, se han descrito casos de *B. thuringiensis* acristalóforos que no producen el cristal paraesporal (Lecadet *et al.*, 1999).

La clasificación en subespecies o variedades de *B. thuringiensis* se basa en el análisis serológico de identificación del antígeno flagelar (antígeno H) y fue introducida a comienzo de 1960 (de Barjac y Bonnefoi, 1962). Hasta 2005 se habían identificado 69 serotipos que comprendían 84 serovares (Lecadet *et al.*, 1999; Reyes-Ramírez y Ibarra, 2005) los cuales forman parte de la colección del International Entomopathogenic *Bacillus* Centre (IEBC), y que se guardan en el Instituto Pasteur de Paris (Francia). Un serovar agrupa a aquellos aislados con idéntica composición antigénica en la proteína flagelar mientras que un serotipo agrupa a aquellos aislados que comparten al menos un factor antigénico, lo que implica que un mismo aislado puede pertenecer simultáneamente a más de un serotipo. Este método es simple y eficiente pero tiene ciertas limitaciones como por ejemplo el problema que se plantea con la clasificación de cepas de *B. cereus* que presentan reacción cruzada y pueden ser consideradas cepas de *B. thuringiensis* acristalóforas, o cuando se produce coagulación espontánea de las células vegetativas (Lecadet *et al.*, 1999).

La clasificación de las subespecies de *B. thuringiensis* por análisis serológico puede ser complementada con el análisis de los caracteres bioquímicos. Aunque este tipo de clasificación no es bastante efectiva por sí misma (de Barjac y Frachon, 1990), puede añadir información valiosa si es utilizada junto a otros métodos (Lecadet *et al.*, 1999). Algunos ejemplos que ilustran otros intentos de clasificación basados principalmente en técnicas moleculares son: análisis del ADN ribosomal 16S (Akhurst *et al.*, 1997), la utilización de marcadores moleculares (Pattanayak *et al.*, 2001; Joung *et al.*, 2001; Soufiane y Côté, 2009), Rep-PCR (Reyes-Ramírez y Ibarra, 2005) y genotipado (Fang *et al.*, 2011).

1.2 LAS TOXINAS DE *B. thuringiensis*

La característica más interesante desde el punto de vista humano de *B. thuringiensis* es la producción de cristales proteicos con acción insecticida. Además de las δ -endotoxinas producidas durante la fase de esporulación, *B. thuringiensis* produce otras proteínas tóxicas, tales como las β -exotoxinas, las enterotoxinas, las exoenzimas, las hemolisinas y las proteínas insecticidas producidas durante la fase vegetativa (Vip, del inglés Vegetative Insecticidal Protein).

1.2.1 β -exotoxinas

Las β -exotoxinas (o thuringiensinas) son pequeñas moléculas (alrededor de 700 Da) termoestables, secretadas de forma soluble durante la fase vegetativa y

tóxicas para diferentes especies de insectos (de Barjac y Dedonder, 1965; Bond *et al.*, 1969). Levinson *et al.* (1990) describieron dos tipos diferentes de β -exotoxinas (I y II) pero la mayoría de los estudios se han focalizado en las β -exotoxinas de tipo I las cuales son análogas a los nucleótidos de adenina (las β -exotoxinas de tipo II parecen ser análogas del uracilo). Además de ser tóxicas frente un amplio abanico de insectos, las β -exotoxinas presentan toxicidad también para mamíferos. Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999) ha recomendado la utilización de aquellas cepas de *B. thuringiensis* que no produzcan β -exotoxinas en el control de plagas, y ha establecido que los productos comerciales basados en Bt deben estar libres de β -exotoxinas. De hecho, un paso importante en el desarrollo y en la producción de bioinsecticidas basados en Bt es la detección de estas β -exotoxinas, que generalmente se realiza por bioensayos con *Musca domestica* o también puede hacerse bioquímicamente, por HPLC (Hernández *et al.*, 2001; Mac Innes y Bouwer, 2009).

1.2.2 Enterotoxinas, hemolisinas y exoenzimas

Otras proteínas tóxicas producidas por algunas cepas de *B. thuringiensis* son las enterotoxinas, las hemolisinas y las exoenzimas. Las enterotoxinas y las hemolisinas han sido descritas como factores de virulencia primarios en *B. cereus*, el cual causa enfermedades gastrointestinales en humanos (Granum y Lund, 1997). Debido a que *B. cereus* y *B. thuringiensis* se encuentran estrechamente relacionados a nivel genético, los mismos genes de virulencia de *B. cereus* se han encontrado en cepas de *B. thuringiensis* y de hecho, se ha hallado este tipo de toxinas en productos comerciales previamente tratados con *B. thuringiensis* como agente insecticida (Damgaard *et al.*, 1996; Gaviria Rivera *et al.*, 2000; Hansen y Hendriksen, 2001; Swiecicka *et al.*, 2006; Frederiksen *et al.*, 2006). Por último, se ha descrito que algunos aislados de *B. thuringiensis* (así como de *B. cereus*) pueden producir enzimas hidrolíticas como fosfolipasas, quitinasas y proteasas, que actúan como factores tóxicos aumentando la actividad tóxica de estas bacterias (Lereclus *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Sergeev *et al.*, 2006; Ramírez-Suero *et al.*, 2011).

1.2.3 Proteínas Vip

Algunas cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* se caracterizan por la producción de unas proteínas insecticidas que no forman parte del cristal paraesporal y que son producidas y secretadas durante la fase de crecimiento vegetativo (Estruch *et al.*, 1996). Estas proteínas, denominadas Vip, a día de hoy

componen un grupo de más de 100 proteínas, divididas en 4 familias y 29 holotipos: Vip1, Vip2, Vip3 y Vip4 (Crickmore *et al.*, 2012).

Las proteínas Vip1 y Vip2 tienen un tamaño de 100 y 52 kDa respectivamente. Son codificadas por el mismo operón y actúan conjuntamente formando una toxina binaria tóxica para larvas de diferentes especies de coleóptero (Warren, 1997). Estudios de homología con otras toxinas binarias han establecido un modelo en el que la proteína Vip1 posee el dominio de unión a un receptor de membrana intestinal y está involucrada en la formación de un poro necesario para la translocación hacia el citoplasma celular de la proteína Vip2, la cual contiene el dominio citotóxico (Leuber *et al.*, 2006).

Las proteínas de la clase Vip3 son estructuralmente diferentes de las toxinas binarias Vip1 y Vip2 y son activas frente a plagas de lepidópteros de gran relevancia económica como *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea* (Estruch *et al.*, 1996; Donovan *et al.*, 2001). Son producidas por *B. thuringiensis* como protoxinas que tienen un tamaño de 88,5 kDa, actúan por ingestión y se procesan en el intestino de las larvas para dar lugar a una toxina activada de 62 kDa. Esta proteína activa causa unos síntomas muy similares a los provocados por las toxinas del cristal paraesporal (Jurat-Fuentes y Jackson, 2012). Su modo de acción incluiría la unión al epitelio intestinal de las larvas susceptibles (Yu *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003; Abdelkefi-Mesrati *et al.*, 2011) y la consecuencia final sería la interrupción de la alimentación y una parálisis del intestino. Se ha descrito que los receptores para las proteínas Vip son diferentes de aquellos implicados en la unión de las proteínas insecticidas que componen el cristal paraesporal (Lee *et al.*, 2006; Sena *et al.*, 2009; Gouffon *et al.*, 2011). De todas formas, su naturaleza sigue sin conocerse, aunque recientemente la proteína ribosomal S2 ha sido sugerida como receptor funcional de la toxina Vip3a en células Sf21 (células en cultivo derivadas del ovario del lepidóptero *S. frugiperda*) (Singh *et al.*, 2010).

1.2.4 δ -endotoxinas

Los cristales paraesporales producidos por *B. thuringiensis* durante la fase de crecimiento estacionario están compuestos por inclusiones proteicas que se denominan δ -endotoxinas o proteínas insecticidas cristalinas (ICPs, según su nomenclatura inglesa) las cuales se dividen en dos tipos: las proteínas Cry (de "crystal") y las proteínas Cyt (de "cytolytic"). La forma de los cristales varía dependiendo de las δ -endotoxinas que los componen, y diferentes tipos de cristal

pueden coincidir en una misma bacteria. La producción de los cristales es un enorme inversión metabólica para *B. thuringiensis*, ya que representan el 20-30% del peso seco de las células esporuladas. La coordinación con la fase estacionaria y los altos niveles de expresión están controlados a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona (Schnepf *et al.*, 1998). Los genes codificantes para las δ -endotoxinas se encuentran generalmente localizados en plásmidos, aunque en algunos casos se han encontrado insertados en el cromosoma bacteriano (Kronstad *et al.*, 1983), y a menudo se encuentran flanqueados por elementos transponibles (de Maagd *et al.*, 2001). Se ha descrito que la conjugación bacteriana entre diferentes cepas puede ocurrir tanto en el suelo como dentro de los insectos (Thomas *et al.*, 2000; 2001), dando como resultado bacterias con capacidades insecticidas ampliadas. El número y el tamaño de los plásmidos presentes en cada cepa es altamente variable, y difiere incluso en cepas pertenecientes a un mismo serovar (Reyes-Ramírez y Ibarra, 2005).

Las proteínas Cry son tóxicas para insectos pertenecientes a los órdenes lepidóptera, díptera, coleóptera, himenóptera, homóptera, ortóptera y mallofaga, y contra nematodos, ácaros y protozoos (Schnepf *et al.*, 1998) mientras que no tienen ningún efecto nocivo para los vertebrados. Las proteínas Cyt son expresadas principalmente en cepas de *B. thuringiensis* tóxicas para dípteros, y exhiben actividad hemolítica (Bravo *et al.*, 2007). Ambas clases de proteínas son solubles en agua y se definen como proteínas formadoras de poros, por su capacidad de insertarse en la membrana apical de las células del intestino de los insectos diana. No obstante, las proteínas Cry y las Cyt no presentan homología de secuencia primaria y tienen diferentes estructuras tridimensionales. En cuanto al mecanismo de acción, cabe destacar que mientras que las proteínas Cry se unen a receptores de membrana específicos, las proteínas Cyt se insertan en la membrana directamente y actúan de forma sinérgica con las proteínas Cry, potenciando su capacidad insecticida (Bravo *et al.*, 2007).

Al principio, los genes codificantes para las δ -endotoxinas fueron clasificados en cuatro clases, basándose principalmente en la especificidad insecticida de las proteínas (Höfte y Whiteley, 1989). La clase I codificaba para proteínas de 130 kDa, normalmente específicas frente a larvas de lepidópteros, los genes de la clase II codificaban para proteínas de 70 kDa activas frente a larvas de lepidópteros y dípteros y la clase III codificaba para proteínas de 70 kDa tóxicas para larvas de coleópteros. Los genes de la clase IV eran activos contra las larvas de dípteros. A esta clasificación fueron luego añadidos los genes de la clase V, que

codifican para proteínas tóxicas para ambos lepidópteros y coleópteros (Tailor *et al.*, 1992). Para simplificar la clasificación de las δ -endotoxinas y evitar las incongruencias que estaban surgiendo con el aumento del número de δ -endotoxinas descritas, Crickmore y colaboradores propusieron en 1998 una nueva nomenclatura que es la que se está siguiendo en la actualidad. Este nuevo sistema se basó en las relaciones filogenéticas entre las δ -endotoxinas y separó la familia de las proteínas Cyt de la familia de las proteínas Cry. A día de hoy las δ -endotoxinas de Bt constituyen un grupo de proteínas con más de 500 genes descritos (Crickmore *et al.*, 2012) y nuevas toxinas son descubiertas constantemente.

Actualmente, existen cuatro grados de clasificación de las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* que dependen del nivel de homología de sus secuencias. El nombre asignado a una particular proteína depende de donde se localizan sus nodos en el árbol filogenético. El primer rango de nomenclatura corresponde a un número arábico (Ejemplo: Cry₁) e indica hasta un 45% de identidad entre proteínas. El segundo rango corresponde a una letra mayúscula (Ejemplo: Cry1A) y requiere entre un 45 y un 78% de identidad. El tercer rango corresponde a una letra minúscula (ejemplo: Cry1Aa) y está comprendido entre un 78 y un 95% de identidad. Finalmente, a una proteína que comparte más del 95% de identidad con otras proteínas conocida se le asigna un segundo número arábico (ejemplo: Cry1Aa₁). Este último rango comprende proteínas del mismo holotipo, o sea proteínas con secuencias idénticas pero aisladas de forma independiente. Por comodidad, la indicación de los últimos dos rangos es opcional.

1.2.4.1 Proteínas Cyt

Según Crickmore *et al.* (1998), las proteínas Cyt se definen como proteínas paraesporales que exhiben actividad hemolítica, o cualquier proteína con similitud de secuencia a las proteínas Cyt ya conocidas (Figura 2). Las proteínas Cyt son proteínas pequeñas, de unos 25 kDa de tamaño, que tienen un único dominio α - β compuesto por hélices- α externas que envuelven una hoja- β (Li *et al.*, 1996) (Figura 3). A pesar de no presentar homología de secuencia primaria ni tampoco de estructura tridimensional con las proteínas Cry, actúan como estas últimas destruyendo las membranas de las células epiteliales del intestino del insecto. Su mecanismo de acción es mucho menos específico que en el caso de las proteínas Cry, ya que *in vitro* resultaron tóxicas hacia una amplia gama de células de insecto y de mamífero (Thomas y Ellar, 1983; Gill y Hornung, 1987).

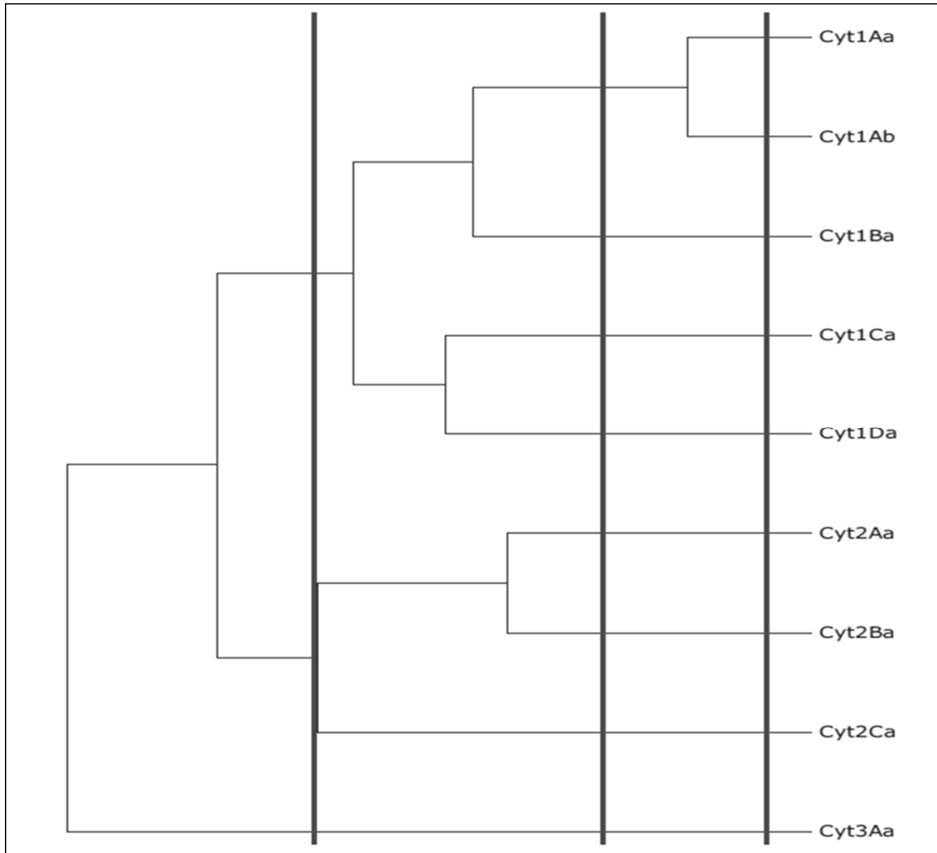


Figura 2: Dendrograma de las familias de las proteínas Cyt. Las líneas verticales indican los límites de identidad (45, 78 y 95%) que marcan los grados de clasificación utilizados en la nomenclatura (Crickmore *et al.*, 2012).

Hoy en día, estas proteínas se agrupan en tres familias: Cyt1, Cyt2 y Cyt3 (Figura 2). Las toxinas Cyt1 y Cyt2 son producidas como proteínas que necesitan una activación proteolítica para pasar a la forma activa. Esta proteólisis elimina pequeñas porciones de ambos extremos N- y C-terminal (Li *et al.*, 1996). El mecanismo por el cual estas proteínas desencadenan su efecto tóxico no está aún totalmente aclarado. Un modelo propuesto supone que las hélices- α de las proteínas se pierden, dejando las hojas- β libres de oligomerizar formando una estructura de barril- β capaz de insertarse en la membrana (Li *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2011). Un segundo modelo de acción propone que las proteínas Cyt no perforan las membranas, si no que se adsorben como agregados en la superficie celular causando defectos en el empaquetamiento celular (Butko, 2003). La mayoría de las proteínas Cyt conocidas se han encontrado en subespecies de *B. thuringiensis* que son específicamente tóxicas para las larvas de dípteros. La característica más conocida

de las proteínas Cyt es la capacidad de potenciar la actividad tóxica de las proteínas Cry (Chang *et al.*, 1993; Federici *et al.*, 2003). En este contexto, se ha sugerido que la proteína Cyt1A actúa sinérgicamente con la proteína Cry11Aa, ejerciendo como su receptor (Pérez *et al.*, 2005).

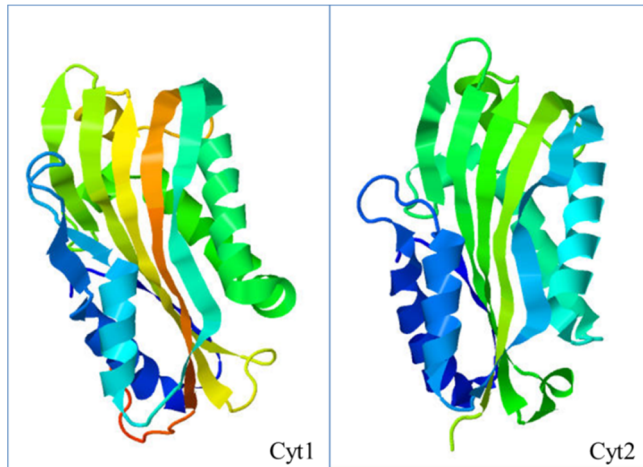


Figura 3: Estructura tridimensional de las proteínas Cyt1 y Cyt2 de *B. thuringiensis*. Estructuras depositadas en el Worldwide Protein Databank (<http://www wwpsdb.org>).

1.2.4.2 Proteínas Cry

Desde la clasificación de Crickmore *et al.* (1998), las proteínas Cry se definen como proteínas que forman parte de la inclusión paraesporal cristalina de *B. thuringiensis* y que tienen un efecto tóxico hacia algún organismo diana, o bien muestran similitud de secuencia con proteínas Cry ya descritas (Figura 4). Esta definición ha generado la aparición de grupos de proteínas definidas como Cry que no están filogenéticamente relacionadas entre ellas, como por ejemplo las proteínas formadas por tres dominios, las toxinas binarias o las toxinas activas contra mosquitos (Crickmore *et al.*, 2012). Las proteínas de tres dominios representan la mayoría de las proteínas Cry, formando 53 de los 70 grupos descritos (Pardo-López *et al.*, 2012) y a partir de ahora cuando hablaremos de proteínas Cry nos referiremos a este grupo de toxinas.

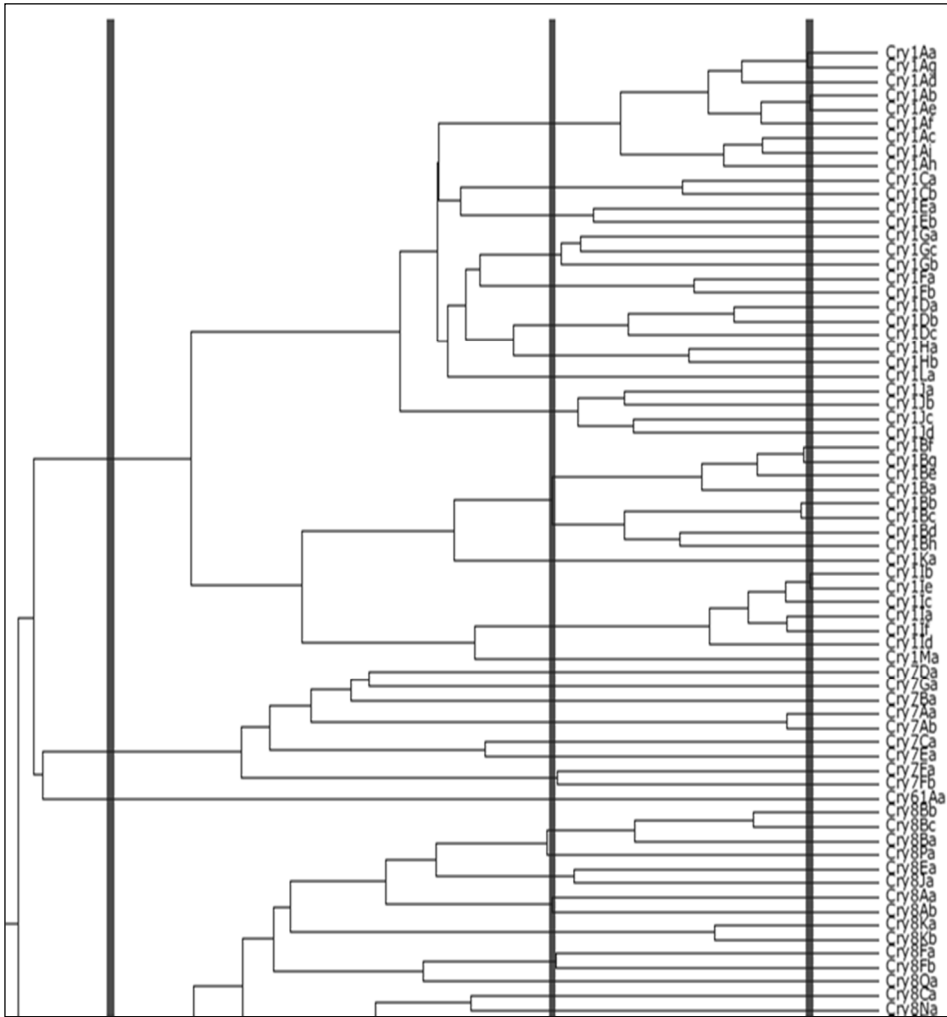


Figura 4: Dendrograma parcial de las familias de las proteínas Cry. Las líneas verticales indican los límites (45, 78 y 95%) de identidad que marcan los grados de clasificación utilizados en la nomenclatura (Crickmore *et al.*, 2012).

Las proteínas Cry son producidas por *B. thuringiensis* como protoxinas que necesitan un corte proteolítico por parte de enzimas presentes en el intestino medio de los insectos, para pasar a la forma activa. Este corte se produce en el ambiente alcalino del intestino de las larvas de lepidópteros y contribuye a definir la especificidad de estas toxinas, ya que el pH intestinal de muchos vertebrados es ácido. Dos tipos de proteínas Cry están descritos en literatura basándose en la dimensión de las protoxinas (Schnepf *et al.*, 1998) (Figura 5). El primer grupo comprende proteínas de 130-140 kDa, que comparten un extremo C-terminal compuesto por 15-17 residuos de cisteínas, necesario para el establecimiento de

puentes disulfuro durante el proceso de formación del cristal (Jurat-Fuentes y Jackson, 2012). Ejemplos de este grupo son las proteínas Cry1, Cry4A y Cry4B. El segundo grupo incluye proteínas de 70-75 kDa como son las proteínas Cry2A, Cry3A o Cry11A, que se parecen a las del grupo anterior en la parte N-terminal pero que no contienen el mismo extremo C-terminal. Mientras que los genes de las proteínas de 130-140 kDa se pueden clonar en *Escherichia coli*, resultando en la producción de inclusiones cristalinas biológicamente activas, los genes de las protoxinas de 70-75 kDa necesitan ser clonados juntos a otros genes “ayudantes” (que en *B. thuringiensis* se encuentran en el mismo operón), para obtener la correcta formación del cristal (Jurat-Fuentes y Jackson, 2012).

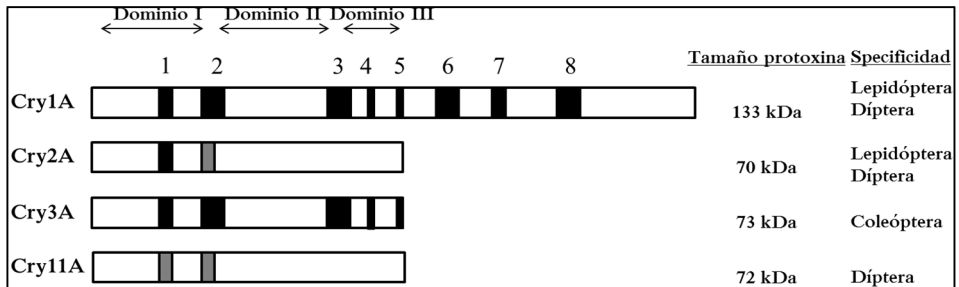


Figura 5: Esquema del alineamiento de los cuatro principales grupos de protoxinas Cry de *B. thuringiensis*, en base al tamaño y a las regiones conservadas. Los bloques numerados representan las secuencias aminoacídicas conservadas. El color negro indica alta homología entre los diferentes grupos, mientras que el color gris indica baja homología. Adaptado de Jurat-Fuentes y Jackson (2012).

La primera estructura tridimensional de una proteína Cry fue descrita en 1991 por Li y colaboradores utilizando cristalografía de rayos X. Desde entonces se han desvelado las estructuras de las proteínas Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry1Ac (Derbyshire *et al.*, 2001), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry3Bb1 (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005), Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006) y Cry8Ea1 (Guo *et al.*, 2009a). A pesar de que estas proteínas presentan una baja homología de estructura primaria (entre 17 y 40%) y que tienen especificidad de acción frente a diferentes órdenes de insecto, la estructura tridimensional formada por tres dominios está altamente conservada entre ellas (Figura 6). El dominio I consiste en siete hélices- α anti-paralelas que, debido a su carácter anfipático, ayudan a la inserción de las proteínas en la membrana epitelial del intestino además de estar implicadas en la oligomerización de las toxinas y formar parte de la estructura de los poros (Bravo *et al.*, 2011). Los dominios II y III constan de hojas- β anti-paralelas, cada uno con una conformación característica. El dominio II tiene una topología de llave griega, y está implicado en el reconocimiento del receptor y por tanto en la especificidad de la acción insecticida. El dominio III tiene una

conformación de barril- β y es imprescindible para la especificidad de la unión (Bravo *et al.*, 2011; Jurat-Fuentes y Jackson, 2012). Ambos dominios tienen homología estructural con diferentes proteínas capaces de unirse a carbohidratos (de Maagd *et al.*, 2003); en particular, el dominio III es muy similar a ciertas moléculas capaces de unirse a galactosa (Kitami *et al.*, 2011).

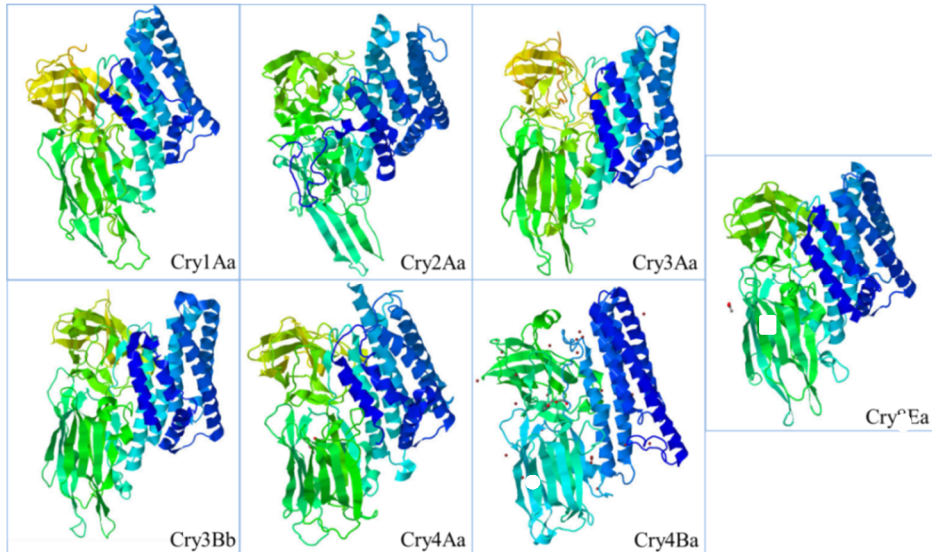


Figura 6: Estructuras tridimensionales de las proteínas Cry de *B. thuringiensis*. Estructuras depositadas en el Worldwide Protein Databank (<http://www.wwpdb.org/>).

Höfte y Whiteley (1989) describieron cinco bloques de secuencia conservados a lo largo de la secuencia N-terminal de muchas proteínas Cry (Figura 5, bloques 1, 2, 3, 4 y 5). Además, encontraron otros tres bloques conservados en la secuencia C-terminal de las protoxinas Cry de 130-140 kDa, dentro de la zona que es eliminada por corte proteolítico durante la activación en el lumen intestinal (Schnepf *et al.*, 1998) (Figura 5, bloques 6, 7 y 8). Los bloques conservados podrían ayudar a explicar porque el mecanismo de acción de todas las proteínas Cry es parecido. La determinación de la estructura tridimensional de las proteínas Cry ha ayudado a la localización espacial precisa de estos bloques. El bloque 1 está formado por la hélice- α central del dominio I, que parece estar implicada en la formación del poro; el bloque 2 incluye la última hélice- α del dominio I y la primera hoja- β del dominio II mientras que el bloque 3 está formado por la última hoja- β del dominio II y la primera del dominio III. Los bloques 4 y 5 se encuentran en el dominio III (Schnepf *et al.*, 1998).

El análisis filogenético de las proteínas Cry ha revelado que la variabilidad de esta familia proteica parece haberse desarrollado siguiendo dos procesos: la evolución independiente de los tres dominios funcionales y el intercambio del dominio III entre diferentes proteínas (Bravo *et al.*, 2011). Por ejemplo, algunos de estos intercambios podrían haber ocurrido entre las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac dando lugar a la toxina Cry1Ab, que comparte los dominios I y II con Cry1Ac y el dominio III con Cry1Aa (Figura 7). Las proteínas Cry1Ca y Cry1Cb, así como las proteínas Cry1Ea y Cry1Eb, comparten una homología de los dominios I y II muy alta pero el dominio III es mucho más parecido entre Cry1Ca y Cry1Ea o entre Cry1Cb y Cry1Eb que entre las proteínas pertenecientes a la misma familia. Además el dominio III de Cry1Cb y de Cry1Eb parece haber derivado de Cry1Be, una proteína de otra familia (Figura 7) (de Maagd *et al.*, 2001). El resultado de estos intercambios produciría proteínas insecticidas específicas frente a nuevas especies de insecto. Un ejemplo de intercambio *in vitro* es la proteína Cry1Ab híbrida, que contiene el dominio III de la proteína Cry1C y presenta una toxicidad hacia *S. exigua* diez veces mayor respecto a la toxicidad inicial de las proteínas originarias que la componen (de Maagd *et al.*, 1996). Recientemente, una proteína híbrida entre los dominios I y II de Cry3Aa y el dominio III de Cry1Ab ha mostrado toxicidad hacia larvas de *Diabrotica virginifera*, contra la cual las proteínas parentales no eran activas (Walters *et al.*, 2010).

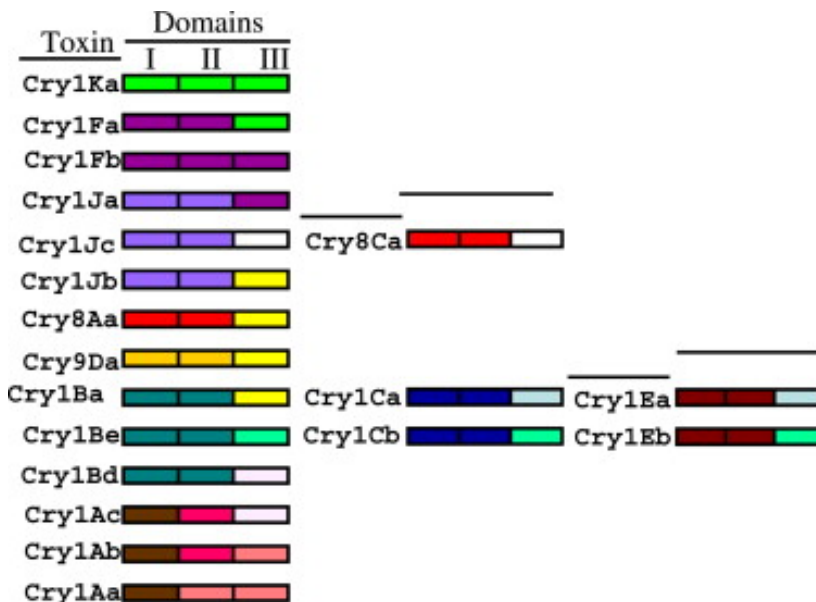


Figura 7: Ejemplos de intercambio del dominio III entre proteínas Cry de *B. thuringiensis*. Los colores representan la similitud aminoacídica (Bravo *et al.*, 2011).

1.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Cry

Las proteínas Cry de *B. thuringiensis* actúan por ingestión y probablemente su función principal es la destrucción de la barrera formada por la membrana epitelial del intestino del insecto, facilitando de esta forma la colonización bacteriana de la hemolinfa, donde las esporas podrían encontrar un lugar idóneo para germinar y la bacteria reproducirse (Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012). El mecanismo de acción se ha estudiado en lepidópteros, en dípteros y en coleópteros. A pesar de que la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo con las proteínas Cry1A en larvas de lepidóptero (Jurat-Fuentes y Jackson, 2012), se considera que el mecanismo de acción es muy parecido para todas las proteínas Cry. Esto es debido en buena parte al alto grado de conservación de la estructura tridimensional de estas proteínas (mencionada en el apartado anterior, Bravo *et al.*, 2007). Sin embargo, el mecanismo molecular por el que se desencadena la muerte de las larvas de los insectos no está aún totalmente dilucidado. Comúnmente se acepta que se trata de un proceso complejo, compuesto por diferentes pasos que empiezan con la solubilización de las proteínas en el lumen intestinal, seguida por la activación, paso a través de la membrana peritrófica y unión a un receptor presente en la membrana, al cual sigue la formación de un poro poco selectivo que permite la salida de solutos de las células y su posterior lisis por osmosis (Schnepf *et al.*, 1998; Ferré y Van Rie, 2002; Whalon y Wingerd, 2003; Vachon *et al.*, 2012). Al lado de este esquema clásico, en los últimos diez años dos grupos de investigación han avanzado dos diferentes hipótesis sobre la cascada de acontecimientos que componen el mecanismo de acción. El primer modelo postula la formación de un oligómero que tras la unión a un receptor secundario se insertaría en la membrana formando poros que causarían un desequilibrio osmótico que llevaría a la rotura celular y como consecuencia final, a la muerte de las larvas (Bravo *et al.*, 2011). El segundo modelo propone que la unión al receptor primario de membrana desencadena una cascada de señales intracelulares que acaban en la muerte celular (Ibrahim *et al.*, 2010). En los siguientes apartados describiremos con más detalle las etapas del mecanismo de acción así como los dos modelos propuestos en lepidópteros.

1.3.1 Solubilización, activación y unión al receptor primario

Tras la ingestión, los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* se solubilizan, en el intestino medio (mesenterón) de las larvas de lepidópteros gracias al elevado pH y a las condiciones reductivas. Después de la solubilización, las protoxinas son atacadas por proteasas intestinales que generan las toxinas activadas

de tres dominios (Figura 6), prácticamente resistentes a posteriores proteólisis. Durante el procesamiento proteolítico las protoxinas de 130-140 kDa pierden alrededor de 500 aminoácidos de la extremidad C-terminal y unos 20-50 aminoácidos de la parte N-terminal, mientras que las protoxinas de 70 kDa son procesadas principalmente por la extremidad N-terminal (Bravo *et al.*, 2011) (Figura 8). Las proteasas intestinales que componen el jugo intestinal de las larvas de lepidópteros son principalmente serin-proteasas (de Maagd *et al.*, 2001). La activación es un proceso de gran importancia en la toxicidad: algunos autores han descrito que la activación *in vitro* de ciertas proteínas Cry las convierte en tóxicas frente a determinados órdenes de insecto para las cuales no son naturalmente activas (Lambert *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1995).

Tras la activación, la proteína tiene el tamaño apropiado para atravesar la membrana peritrófica cuya función es formar una barrera protectora entre el lumen intestinal (y su contenido) y la superficie apical del epitelio intestinal, lo que se denomina espacio periplásmico. Aunque al principio se consideró la membrana peritrófica como un filtro inerte, se ha demostrado que diferentes proteínas Cry son capaces de unirse a las proteínas de esta membrana (Rodrigo-Simón *et al.*, 2006; Rees *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha observado que la destrucción de la membrana peritrófica no resulta en un aumento de la toxicidad de las proteínas Cry (Rees *et al.*, 2009).

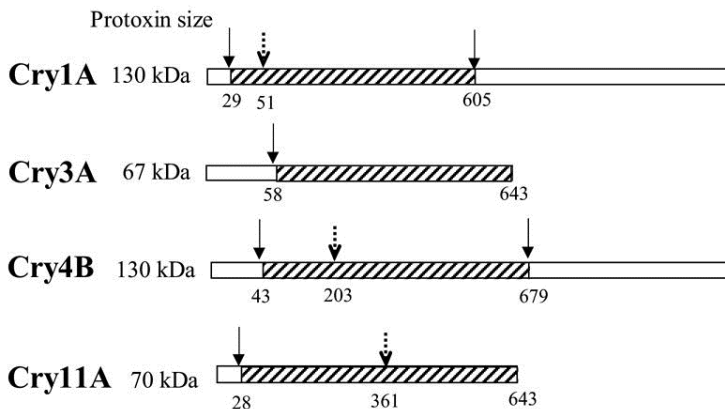


Figura 8: Tamaño relativo de las protoxinas Cry y sitios de corte proteolítico. Las barras blancas representan las protoxinas mientras que las barras rayadas representan a la forma activa de las proteínas. Las flechas continuas indican los sitios de corte a las extremidades de las toxinas activadas mientras que las flechas discontinuas indican sitios de corte intramoleculares (Bravo *et al.*, 2007).

El siguiente paso es la unión de alta afinidad de las proteínas Cry a una o varias proteínas de las microvellosidades intestinales que denominaremos

“receptores”. La especificidad de acción de las proteínas Cry está determinada por esta unión (Pigott y Ellar, 2007; Bravo *et al.*, 2011) y se han invertido gran cantidad de tiempo y esfuerzo para establecer la naturaleza de tales receptores. La correlación entre unión y especificidad se ha demostrado utilizando vesículas de membrana intestinal del borde en cepillo (BBMV, según su nomenclatura inglesa). Después de los primeros estudios que pusieron de manifiesto que la unión de las toxinas Cry a la membrana epitelial es un requisito esencial para la toxicidad (Hofmann *et al.*, 1988; Van Rie *et al.*, 1989; 1990a), se obtuvieron casos en los cuales la afinidad de la unión no concordaba con los niveles de toxicidad (Wolfersberger, 1990). Ulteriores estudios propusieron un modelo de unión compuesto por una unión reversible y una irreversible, siendo esta última la verdadera determinante de la toxicidad de las proteínas Cry (Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995). La unión irreversible parece producirse al insertarse las proteínas Cry en la membrana epitelial (Chen *et al.*, 1995), después de la formación de un oligómero (Aronson *et al.*, 1999; Ihara y Himeno, 2008; Obata *et al.*, 2009). A día de hoy, se han caracterizado diferentes moléculas del epitelio intestinal capaces de unir a las proteínas Cry y que por tanto se definen como candidatas a receptores (Tabla 1). También se han realizado numerosos ensayos de unión, denominados de competencia heteróloga, utilizando BBMV preparadas a partir del intestino de diferentes especies de lepidópteros. Estos ensayos han permitido demostrar que algunas proteínas Cry pueden competir por el mismo sitio de unión. A partir de estos datos, se han construido modelos de unión para diferentes especies de lepidópteros plaga, generando información valiosa para el diseño de estrategias de utilización de las toxinas Cry (Hua *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2001; Estela *et al.*, 2004; Alcantara *et al.*, 2004; Hernández y Ferré, 2005; González-Cabrera *et al.*, 2006; Hernández –Rodríguez *et al.*, 2008; Gouffon *et al.*, 2011).

Tabla 1: Proteínas del epitelio intestinal propuestas como receptores para las proteínas Cry1, en diferentes especies de lepidópteros. Tabla adaptada de Bravo *et al.* (2011).

Especie ^a	Molécula receptora candidata
<i>Ms, Hv, On, Ha, Bm, Pg</i>	Caderina
<i>Ms, Bm, Ha, Hv, Ld, Px, SI</i>	Aminopeptidasas N
<i>Ms, Ha, Hv</i>	Fosfatasas alcalinas
<i>Ld</i>	270 kDa glicoconjugado
<i>Bm</i>	P252

^a (*Ms*) *M. sexta*, (*Hv*) *Heliothis virescens*, (*On*) *Ostrinia nubilalis*, (*Ha*) *Helicoverpa armigera*, (*Bm*) *B. mori*, (*Pg*) *Pectinophora gossypiella*, (*Ld*) *Lymatria dispar*, (*Px*) *Plutella xylostella*, (*SI*) *Spodoptera litura*.

1.3.1.1 Caderina

La caderina asociada a la acción tóxica de *B. thuringiensis* pertenece a una gran familia de glicoproteínas transmembrana, dependientes de calcio. En general, las proteínas de la familia de las caderinas están involucradas en diferentes procesos como la adhesión entre células, la migración celular, la organización del citoesqueleto y la morfogénesis (Bel y Escriche, 2006; Pigott y Ellar, 2007). Las caderinas asociadas a la toxicidad de *B. thuringiensis* en insectos están formadas por tres dominios: el dominio citoplasmático, el dominio transmembrana y una parte extracelular (Bel y Escriche, 2006) aunque ciertos autores definen la zona extracelular próxima a la membrana como un cuarto dominio (Pigott y Ellar, 2007) (Figura 9). En lepidópteros, el dominio extracelular de este tipo de caderina está formado por 11 o 12 repeticiones de tipo caderina, cada una compuesta por unos 110 aminoácidos que forman hojas- β organizadas en forma de barril- β (Ibrahim *et al.*, 2010). La zona de unión a las proteínas Cry se ha localizado en la parte extracelular de la caderina y tres diferentes epítomos que se sitúan en las repeticiones de tipo caderina 7, 11 y 12 han sido descritos (Pardo-López *et al.*, 2012). Mientras que para las zonas de unión propuestas en las repeticiones de tipo caderina 11 y 12 se ha demostrado un papel en la citotoxicidad de la proteína Cry1Ab (Hua *et al.*, 2004; Griko *et al.*, 2007) el papel de la zona de unión presente en la repetición de tipo caderina 7 ha sido solamente estudiado *in vitro* (Gómez *et al.*, 2001; 2003) (Figura 9). La localización clásica de las caderinas en las células intestinales suele ser en las membranas laterales, en zonas de unión entre células. Por el contrario, la caderina asociada a la toxicidad de las proteínas Cry se sitúa en la membrana apical de las células del epitelio intestinal. Aún no se ha aclarado su verdadera función fisiológica, aunque se supone esté involucrada en el mantenimiento de la organización del tejido epitelial del intestino (Bel y Escriche, 2006).

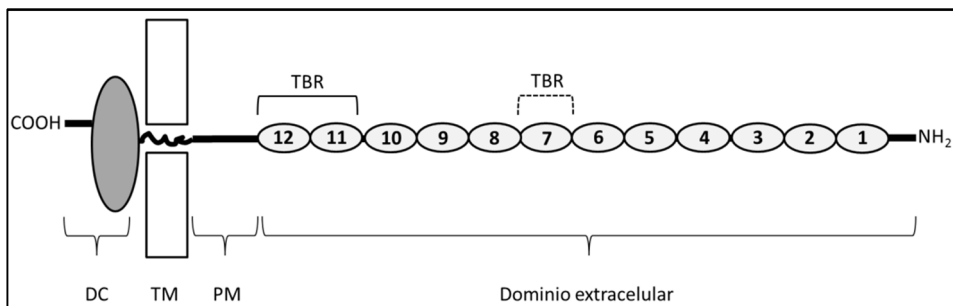


Figura 9: Representación esquemática de la caderina de lepidópteros. DC: dominio citoplasmático, TM: dominio transmembrana, PM: zona extracelular próxima a la membrana, TBR: del inglés toxin binding region, zona de unión propuestas de las proteínas Cry.

1.3.1.2 Aminopeptidasas N (APN)

Las APN son metaloproteasas dependientes de zinc que pertenecen a la familia de proteasas M1 (Sjöström *et al.*, 2000) y que hacen parte del grupo de las gluzincinas (Hooper, 1994). Están ampliamente distribuidas en todo el reino animal así como en las plantas y están involucradas en numerosos procesos, como por ejemplo en el recambio proteico. Se cree que su presencia en el intestino de las larvas de insecto está relacionada con la digestión, ya que estas enzimas hidrolizan los aminoácidos neutros presentes en las extremidades N-terminal de los péptidos derivados de la acción de las endopeptidasas y, en cooperación con las carboxipeptidasas, digieren estas moléculas liberando los aminoácidos necesarios para la nutrición del insecto (Terra y Ferreira, 1994).

Las APN se caracterizan por dos motivos proteicos altamente conservados: el motivo de unión al zinc típico de las gluzincinas HEXXH(X₁₈)E y el motivo GAMEN. Las APN de lepidópteros son proteínas extracelulares de alrededor de 100 - 150 aminoácidos que se encuentran asociadas a la membrana apical de las células epiteliales gracias a un anclaje entre su extremidad C-terminal y un fosfoglicano, el glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Garczynski y Adang, 1995). Debido a este anclaje GPI, las APNs se localizan en microdominios de la membrana lipídica llamados balsas lipídicas que se caracterizan por su alto contenido en colesterol y esfingolípidos (Zhuang *et al.*, 2002). Estos dominios son más densos que la membrana lipídica en la cual se encuentran y flotan en el conjunto de los demás lípidos. En *M. sexta* se detectó una asociación entre las proteínas Cry1A y estas regiones, cuya integridad es fundamental para la formación de poro *in vitro* (Zhuang *et al.*, 2002). Además de las modificaciones post-traduccionales relacionadas con la exportación de las proteínas y el anclaje GPI, las APN están sujetas tanto a N- como a O-glicosilación (Sjöström *et al.*, 2000).

Desde que se describió la primera APN con capacidad de unión a las proteínas Cry en larvas de *M. sexta* (Knight *et al.*, 1994), esta familia proteica ha sido ampliamente estudiada por ser sus miembros candidatos a receptores de las proteínas Cry, y hasta hoy más de 100 isoformas han sido depositadas en las bases de datos. Pigott y Ellar (2007) comentaron en su revisión que cada insecto expresa más de una isoforma de APN y que solo una isoforma cada clase ha sido descrita en cada especie. Se ha propuesto que las isoformas de APN expresadas en el intestino de las larvas de lepidópteros derivan de múltiples eventos de duplicación génica, ocurridos en un progenitor ancestral (Chang *et al.*, 1999). Recientemente, Valaitis (2008) ha demostrado que en *L. dispar* la intoxicación provocada para las proteínas

Cry provocaba un desprendimiento rápido y masivo de las APN de las células epiteliales del intestino hacia el lumen intestinal.

1.3.1.3 Fosfatasa alcalina (ALP)

Las ALP de lepidópteros son proteínas extracelulares glicosiladas, de unos 70 kDa de tamaño, sujetas a la membrana apical de las células epiteliales mediante un anclaje tipo GPI de la misma forma que las APN (Jurat-Fuentes y Adang, 2004). Debido a su anclaje GPI, las ALP también se localizan en las balsas lipídicas. El papel de la ALP en la unión a las proteínas Cry se ha caracterizado de forma más extensa en *H. virescens* (Jurat-Fuentes y Adang, 2006a) y en *M. sexta* (Arenas *et al.*, 2010).

1.3.1.4 Otros "receptores" candidatos

En larvas de *L. dispar* y de *B. mori* se han descrito otras proteínas con afinidad por las proteínas Cry. Un glicoconjugado de tamaño de 270 kDa se ha aislado de las membranas epiteliales de *L. dispar* y se ha caracterizado por su capacidad de unión con alta afinidad a las proteínas Cry1A y Cry1B (Valaitis *et al.*, 2001). Se trata de una proteína aniónica, altamente glicosilada, la cual se encuentra en las microvellosidades del epitelio intestinal (Valaitis, 2011). En 2004, en *B. mori* se caracterizó una proteína de 252 kDa de tamaño, con capacidad de unión a las proteínas Cry1A (Hossain *et al.*, 2004). Posteriores estudios identificaron esta proteína como perteneciente a la familia de las lipocaínas y sugirieron que tiene la capacidad de formar complejos con actividad antimicrobiana (Pigott y Ellar, 2007; Pandian *et al.*, 2010).

Análisis proteómicos con geles en dos dimensiones han identificado otras proteínas de las BBMV de *M. sexta*, *H. virescens* y *H. armigera* (como por ejemplo la actina, las subunidades A y B de la V-ATPasa y una proteína de choque térmico HSC) como proteínas capaces de unirse a la proteína Cry1Ac (McNall y Adang, 2003; Krishnamoorthy *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010b).

1.3.2 Modelo de la formación de poro

El modelo de la formación de poro ha sido caracterizado en gran parte en *M. sexta*, utilizando la proteína Cry1Ab. Según este modelo, la proteína Cry activada, pasa por una serie de uniones secuenciales a diferentes receptores de membrana, pasando de su forma monomérica a agregarse formando un oligómero que se inserta en la membrana provocando la apertura de un poro que es responsable de choque osmótico y de la consiguiente muerte de las células (Bravo

et al., 2011) (Figura 10). La primera interacción entre la proteína Cry activada y las proteínas del epitelio intestinal del insecto consiste en una unión de baja afinidad a las APN y ALP con anclaje GPI, presentes de forma abundante en la membrana apical de las células epiteliales (Pacheco *et al.*, 2009a). Esta interacción concentra de alguna manera las toxinas que se encuentran en el espacio periplásmico en la zona cercana a las microvellosidades de la membrana, favoreciendo el acercamiento, la interacción y la posterior unión de alta afinidad con la caderina (Gómez *et al.*, 2006). La unión a la caderina facilita un último paso de proteólisis del extremo N-terminal de la toxina, que pierde la primera hélice- α del dominio I, lo que provoca su agregación formando un oligómero (Gómez *et al.*, 2002). La oligomerización aumenta la afinidad de las toxinas por las APN y las ALP, a las cuales se une el oligómero (Pacheco *et al.*, 2009a; Arenas *et al.*, 2010) para insertarse posteriormente en la membrana epitelial formando un poro. La formación del poro tiene como consecuencia un aumento de la permeabilidad celular que destruye las diferencias de potencial entre el interior celular y el exterior, teniendo como consecuencia la lisis celular.

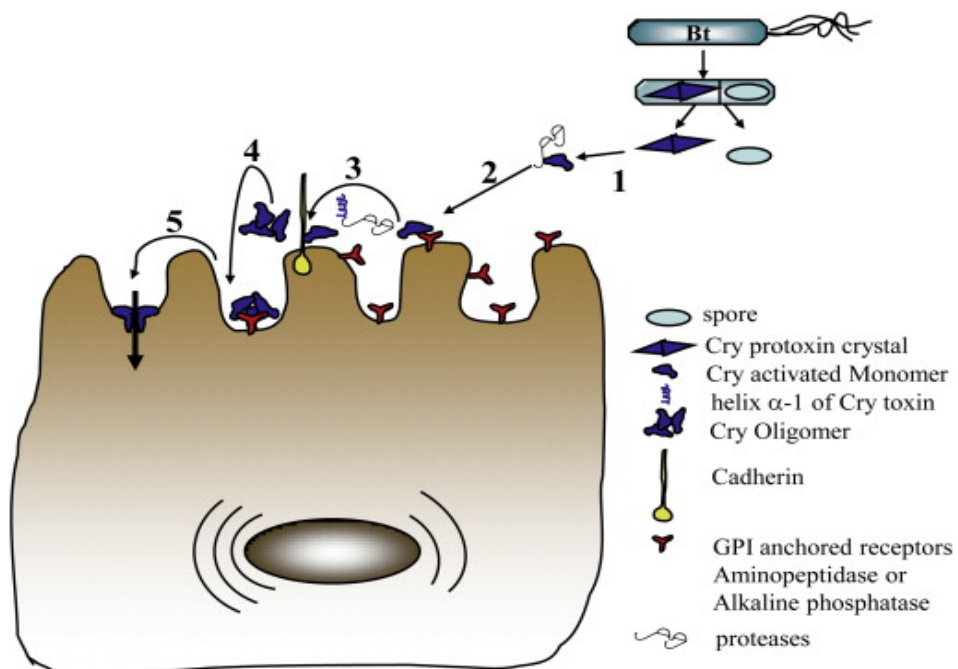


Figura 10: Modo de acción de las proteínas Cry1A en *M. sexta*. 1) Solubilización y activación, 2) Unión del monómero a las APN y a las ALP, 3) Unión del monómero a la caderina y proteólisis del dominio I de la toxina, 4) Formación del oligómero y unión de alta afinidad a las APN y a las ALP, 5) Inserción del oligómero en la membrana (Bravo *et al.*, 2011).

Aunque en este modelo se considera la formación del poro como la causa principal de la muerte del insecto, también se ha especulado que las interacciones de las proteínas Cry con los receptores podrían ser el inicio de una transducción de señales intracelulares cuya respuesta sería la muerte celular (Jurat-Fuentes y Adang, 2006a; Gómez *et al.*, 2007). Diferentes observaciones avalan parte de este modelo, como la contribución de la caderina a ambas uniones reversible e irreversible de la proteína Cry1Ab a las BBMV de *B. mori* y la contribución de las APN solamente a la parte irreversible de la misma unión (Ibiza-Palacios *et al.*, 2008) o la inducción *in vitro* de la formación del oligómero, incubando las proteínas Cry con péptidos de caderina que contienen la región de unión a la toxina (Pacheco *et al.*, 2009b; Peng *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que las estructuras oligoméricas, pero no los monómeros, penetran las BBMV de *M. sexta* y *B. mori* (Muñoz-Garay *et al.*, 2006; Ihara y Himeno, 2008) y que la proteína Cry1Ab con mutaciones en el dominio I se une a las BBMV de *M. sexta*, pero sin formar oligómeros ni poros, resultando ser no tóxica (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007). Por otra parte, cabe añadir que se ha demostrado que la formación de oligómero también puede ocurrir *in vitro* sin la presencia de la caderina (Guereca y Bravo, 1999; Vié *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2009b). Recientemente, unos autores pusieron de manifiesto la necesidad de ulteriores estudios para la validación de este modelo (Vachon *et al.*, 2012).

1.3.3 Modelo de la cascada de señales

Este segundo modelo fue propuesto por Zhang *et al.* (2006) y postula que, a diferencia del modelo anterior, la unión de las proteínas Cry a la caderina desencadena una ruta de señalización intracelular dependiente de Mg^{2+} que acaba con la muerte celular (Figura 11). Todas las pruebas de este segundo mecanismo de acción han sido obtenidas con cultivos celulares que expresan la caderina de *M. sexta*. Según este modelo, la unión de la proteína Cry en su forma monomérica a la caderina estimula a dos proteínas: la proteína G y la adenilato ciclasa las cuales provocan un drástico aumento de la concentración de AMPc. El AMPc activa las proteín-quinasa A, de las cuales dependen una serie de alteraciones celulares que finalizan con la muerte celular (Zhang *et al.*, 2005; 2006). Además, este mecanismo promueve la translocación de la caderina por exocitosis, desde vesículas de membrana intracelulares a la membrana apical de las células, para amplificar la señalización que lleva a la muerte del insecto (Zhang *et al.*, 2008).

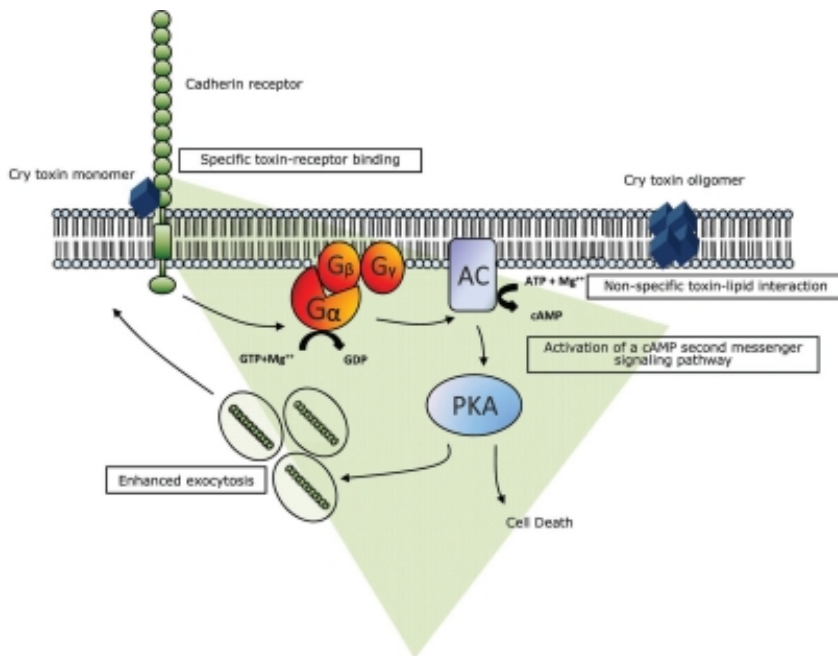


Figura 11: Modelo de la cascada de señales. La proteína Cry se une a la caderina estimulando las proteínas G, la adenilato ciclasa (AC) y consecuentemente a una proteína-quinasa A (PKA) la cual promueve la muerte celular. La activación de esta señalización provoca un aumento del número de moléculas de caderina en la membrana epitelial debido a exocitosis, resultando en una amplificación de la señal. Los oligómeros se incorporan en la membrana pero no provocan poros ni son tóxicos para las células (Ibrahim *et al.*, 2010).

1.4 APLICACIONES DE *B. thuringiensis*

1.4.1 Formulados insecticidas

Los formulados insecticidas basados en *B. thuringiensis* (formulados Bt) se componen principalmente de una mezcla de esporas y cristales proteicos. El primer formulado Bt que se produjo a nivel comercial se desarrolló en Francia en el 1938, con el nombre comercial de Sporeine (Ananda Kumar *et al.*, 1996), y se tuvo que esperar hasta 1961 para que en un formulado Bt fuera registrado en EEUU como pesticida (Sanahuja *et al.*, 2011). Durante los años sesenta, en EEUU, Francia, Alemania y Unión Soviética se produjeron muchos formulados comerciales Bt. En aquellos años, la comercialización de estos productos insecticidas se estimuló de forma especial por el aislamiento en 1962 por Kurstak y después por Dulmage en 1967 de la variedad *kurstaki*, altamente efectiva frente a las plagas de lepidópteros (Dulmage, 1970). La cepa HD1 de la var. *kurstaki* es un ingrediente activo de muchos productos insecticidas (por ejemplo Thuricide o Dipel ES) utilizados en

agricultura y silvicultura contra las larvas de lepidópteros. Posteriormente, el descubrimiento de nuevas cepas de *B. thuringiensis*, activas frente a diferentes especies pertenecientes a diferentes órdenes, ha aumentado el espectro de toxicidad de los productos basados en Bt (Ananda Kumar *et al.*, 1996). Las variedades más utilizadas en la producción de formulados Bt son las subespecies *kurstaki*, *morrisoni*, *thuringiensis* y *aizawai*, contra lepidópteros, *israeliensis* contra los mosquitos y *tenebrionis* y *japonensis* contra los coleópteros (Jurat-Fuentes y Jackson, 2012). La búsqueda de cepas con características mejoradas (toxinas nuevas o más potentes) sigue en la actualidad y los avances en la biología molecular han sido empleados para la producción de nuevas cepas genéticamente mejoradas, por ejemplo para la producción múltiple de toxinas en una sola cepa (Sanahuja *et al.*, 2011).

A día de hoy, los bioinsecticidas cubren el 2% del mercado total de los productos para la protección de las plantas, y el 90% de los biopesticidas vendidos están basados en Bt. El éxito de estos productos viene de sus características, que los hacen ser muy respetuosos con el medioambiente: son altamente específicos para las plagas diana, no tienen ningún efecto sobre humanos, fauna silvestre, insectos benéficos y polinizadores, y son biodegradables (Sanchis y Bourguet, 2009). Esta última característica es también el mayor factor limitante en la utilización de los formulados Bt, junto con la falta de actividad sistémica. Las proteínas de *B. thuringiensis* son sensibles a la luz ultravioleta y se degradan a los pocos días de su aplicación (Sanahuja *et al.*, 2011). Por tanto, las aplicaciones de los formulados Bt tienen que sincronizarse con la presencia de las larvas recién nacidas (el estadio del desarrollo larvario de mayor susceptibilidad a las toxinas Cry). Para obviar el problema de la falta de estabilidad se han puesto a punto métodos de encapsulación de las proteínas Cry en la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (por ejemplo los productos MVP y M-Trak de Mycogen) la cual les proporciona protección frente a la luz ultravioleta y a la degradación química (Grace y Ewart, 1996). Este método también elude otra preocupación surgida acerca del uso comercial de *B. thuringiensis*: la persistencia de las esporas Bt en el suelo y en el agua.

1.4.2 Plantas transgénicas Bt

La producción de plantas cultivadas que sean resistentes al ataque de las plagas ha sido desde siempre un reto para los seleccionadores de material vegetal. Por esta razón, los genes codificantes las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* se han transferido a cultivos de interés económico para conferirles una protección efectiva contra los fitófagos (Shelton *et al.*, 2002). La creación de estas plantas

transgénicas con capacidad insecticida, llamadas plantas Bt, solucionó problemas de los formulados Bt como la falta de estabilidad en condiciones de campo debida a la luz UV y la incapacidad de llegar a todos los tejidos de las plantas, que los hacía inefectivos contra los insectos barrenadores o taladros. Las primeras plantas Bt se obtuvieron en 1987 y fueron plantas de tabaco (Barton *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987) y de tomate (Fischhoff *et al.*, 1987) que contenían un gen codificante para la forma activada de una proteína Cry. Estas primeras plantas transgénicas tenían niveles de expresión de las proteínas Cry demasiado bajos para conferir una protección eficaz frente a las plagas agrícolas. Estudios más profundos evidenciaron que los genes bacterianos de *B. thuringiensis* tenían un contenido muy alto de A y T, comparados con los genes vegetales. Esto tuvo como consecuencia que el código genético de los genes bacterianos insertados en las plantas era erróneamente traducido a nivel de sitios de poliadenilación, y las moléculas de ARNm producidas contenían motivos de inestabilidad o sitios de corte y empalme crípticos que eran reconocidos como intrones por parte de las plantas (de Maagd *et al.*, 1999). La adaptación de los genes *cry* a la maquinaria transcripcional y traductora de las plantas dio como resultado la obtención de niveles de expresión cien veces más altos de los iniciales (Perlak *et al.*, 1991) y la utilización de diferentes tipos de promotores de la transcripción mejoró aún más las prestaciones de las plantas Bt. Pronto se transformaron diferentes especies vegetales con los genes *cry* y, de hecho, durante los años noventa se realizaron las primeras pruebas de campo de plantas Bt de tomate, tabaco, patata, algodón, maíz y arroz (Sanahuja *et al.*, 2011) y nuevos cultivos transformados se están desarrollando continuamente.

A día de hoy, los únicos cultivos Bt comercializados son algodón y maíz cuya salida al mercado empezó en 1996 y, desde 1996 hasta 2002, también se comercializaron patatas Bt que expresaban la proteína Cry3A, activa frente al escarabajo de la patata. En 2011, se plantaron 66,1 millones de hectáreas con plantas Bt en todo el mundo, que equivalen a un incremento del 22% respecto al año precedente (James, 2011). EEUU lidera el grupo de los países que cultivan plantas Bt seguido por Brasil, Argentina e India. Al revés, la UE no ha aún totalmente aceptado esta tecnología, y solo unos pocos países han cultivado unas pocas hectáreas a fines comerciales. La excepción es España que liberalizó el cultivo de maíz Bt en 1998. En 2012, el área cultivada con maíz Bt cubrió 116000 hectáreas, según datos del ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente, representando el 30% de toda la superficie cultivada a maíz en España.

Los cultivos Bt se pueden definir de primera, segunda y tercera generación según el número de toxinas que expresan (Bravo *et al.*, 2011). Los cultivos de primera generación fueron las plantas desarrolladas inicialmente que expresan un solo gen *cry*, como por ejemplo el algodón Bollgard de Monsanto (que expresa la proteína Cry1Ac) o el maíz Compa CB de Syngenta (que expresa la proteína Cry1Ab). En 2002, con la aprobación a la comercialización del algodón Bollgard II (Monsanto) que expresa las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab, se abrieron las puertas del mercado a las plantas Bt de segunda generación que combinan dos diferentes proteínas Cry con el intento de retrasar la aparición de resistencia y ampliar el espectro de las plagas diana. Finalmente, la tercera generación de plantas transgénicas expresa una combinación de diferentes toxinas: además de las proteínas Cry1, Cry2 ó Cry3, se utilizan otras proteínas de *B. thuringiensis*, como las toxinas binarias Cry34Ab y Cry35Ab, o las toxinas Vip.

La gran ventaja medioambiental de las plantas Bt reside en la reducción en la utilización de pesticidas en el campo, evitando así posibles daños ocasionados al entorno y reduciendo el riesgo para los agricultores. Esto es posible porque estas plantas expresan las proteínas Cry de *B. thuringiensis* a altas dosis durante toda la temporada vegetativa, proporcionando protección constante frente a los fitófagos diana. Además, el cultivo de las plantas Bt no solo disminuye el uso de insecticidas, si no también ahorra los combustibles fósiles que se necesitan para las aplicaciones y ayuda a la conservación del suelo promoviendo el laboreo mínimo (Sanahuja *et al.*, 2011). De hecho, la reducción acumulativa de la utilización de pesticidas en el periodo que va desde 1996 a 2008 en las áreas cultivadas con plantas Bt ha sido estimada en 171500 toneladas, mientras que la emisión de gas de efecto invernadero se redujo de 10 millones de toneladas y 1,9 mil millones de litros de combustible diesel no fueron utilizados (Brookes y Barfoot, 2010).

A pesar de los beneficios expuestos anteriormente, el cultivo a gran escala de las plantas Bt ha planteado interrogantes acerca de sus posibles efectos adversos a largo plazo sobre el medioambiente. Los principales problemas que podrían derivar de esta tecnología son la aparición de resistencia en los insectos diana, el potencial impacto sobre el suelo y sobre los insectos beneficiosos como los predadores y los parasitoides, el posible aumento del número de plagas secundarias y la transferencia horizontal de los transgenes a las especies silvestres más cercanas. Aunque a día de hoy no se hayan evidenciado efectos perjudiciales debidos al uso de las plantas Bt, la vigilancia sobre los posibles efectos negativos no tiene que bajar ya que se necesita llegar a una estrategia de utilización que proporcione un

equilibrio global entre beneficios y desventajas (Mendelsohn *et al.*, 2003; Christou *et al.*, 2006; Sanahuja *et al.*, 2011).

1.5 RESISTENCIA A LAS PROTEÍNAS Cry

1.5.1 Generalidades

La resistencia a los insecticidas se define como “un cambio heredable en la sensibilidad de una población de plagas a un determinado producto que se refleja en una pérdida en eficacia de ese producto para conseguir el nivel de control esperado” (IRAC, 2012). Se trata de un fenómeno evolutivo, resultante de la presencia de biocidas en el ambiente a donde vive la población de insectos (Yu, 2008). A día de hoy, más de 570 especies de insectos y ácaros han desarrollado resistencia a uno o a más insecticidas (<http://www.pesticideresistance.org/DB>). Las pérdidas económicas causadas por las plagas de insectos están estimadas mundialmente en mil millones de euros cada año (Yu, 2008) y para la protección de los cultivos, la aparición de la resistencia es una amenaza muy grave. La aparición de insectos resistentes se debe en gran medida a la enorme variabilidad genética que estos poseen que hace posible la selección de individuos resistentes tanto a insecticidas biológicos como químicos (Tabashnik y Carriere, 2008). La velocidad de aparición de la resistencia depende de muchos factores diferentes, tanto de tipo genético (número y frecuencia de los alelos de la resistencia, tipo de herencia) como de tipo biológico (número de generaciones por año, migración, eficacia biológica de los individuos resistentes), así como del tipo de insecticida utilizado y de su aplicación.

El primer caso de resistencia frente a un producto comercial de *B. thuringiensis* se notificó en 1985 (McGaughey) en una colonia de *Plodia interpunctella* procedente de silos tratados. Sin embargo, desde la comercialización del primer producto basado en *B. thuringiensis* transcurrieron más de cincuenta años hasta que se encontraron las primeras pruebas de la aparición de resistencia en campo, en poblaciones de *P. xylostella* de Hawái y Filipinas (Tabashnik *et al.*, 1990; Ferré *et al.*, 1991), seguidas por más casos en la misma especie en diferentes partes del mundo (Ferré *et al.*, 2008). Más recientemente, se ha descrito un nuevo caso de aparición de resistencia en campo (en invernaderos de Canadá) en otro lepidóptero, *Trichoplusia ni*, (Janmaat y Myers, 2003).

El continuo aumento a nivel mundial de la superficie cultivada con plantas Bt, a partir de 1996 ha ejercitado una fuerte presión de selección sobre los lepidópteros diana. Sin embargo, hasta ahora se han descrito solo tres casos claros

de resistencia aparecida en campo, dos de los cuales han ocurrido bajo condiciones peculiares. La primera aparición de resistencia a plantas Bt fue descrita en Puerto Rico para una población de *S. frugiperda* controlada con el maíz Bt que expresa la proteína Cry1F (Storer *et al.*, 2010). La susceptibilidad moderada de esta plaga frente a la proteína expresada por el maíz, la plantación continua durante todo el año de las plantas Bt, la limitada migración de los insectos y las condiciones de sequía que concentraron las poblaciones de la plaga en los campos Bt irrigados, contribuyeron a ejercer unos niveles de presión de selección muy elevados sobre las poblaciones silvestres de *S. frugiperda*, resultando en la aparición de la resistencia tras unos pocos años de cultivo del maíz Bt. En Sudáfrica se describieron problemas de control del taladro africano del maíz, *Busseola fusca*, por parte del maíz Bt que expresa proteína Cry1Ab (Kruger *et al.*, 2011a; 2011b). También en este caso, la plaga que desarrolló resistencia al maíz Bt no era muy susceptible a la toxina expresada, y se debe añadir que los agricultores sudafricanos no estaban cumpliendo con uno de los requisitos establecidos en las estrategias de manejo de la resistencia que consiste en plantar zonas “refugio” de maíz convencional adyacentemente a los cultivos Bt para favorecer el apareamiento casual entre posibles individuos resistentes y susceptibles. El tercer caso de resistencia a plantas Bt fue descubierto en India (Dhurua y Gujar, 2011). En este caso, la resistencia apareció en una plaga, *P. gossypiella*, altamente susceptible a la proteína Cry1Ac expresada por el algodón Bollgard, ampliamente utilizado en India durante años. Por último, cabe señalar que Tabashnik *et al.*, (2008; 2009) comunicaron un cuarto caso de resistencia en campo relativo a *H. zea*, aparecido en los cultivos de algodón Bt de EEUU, aunque en este caso, otros grupos de investigación (Moar *et al.*, 2008) se mostraron en desacuerdo con los análisis y las conclusiones obtenidas de dichos datos.

1.5.2 Bases genéticas de la resistencia

El conocimiento de las bases genéticas de la resistencia a *B. thuringiensis* es fundamental para el desarrollo de estrategias que retrasen o impidan su aparición en campo. El fenómeno de la resistencia no está aún totalmente aclarado, que es una información esencial para la utilización de las plantas transgénicas. A pesar de los pocos casos de resistencia en campo surgidos recientemente, los estudios de selección en laboratorio se han llevado a cabo desde hace más de quince años y han contribuido a establecer los conocimientos actuales sobre las bases genéticas y bioquímicas de la resistencia (Ferré y Van Rie, 2002). Aunque las colonias de laboratorio normalmente poseen una variación genética limitada y no contienen todos los genes y alelos de resistencia presentes en el campo, pueden darnos

indicaciones sobre los mecanismos genéticos más comunes de resistencia presentes en ciertas poblaciones de insectos plaga.

La variabilidad genética intraespecífica es un factor muy importante que nos puede permitir estimar el potencial de una especie de desarrollar resistencia a *B. thuringiensis* (Ferré y Van Rie, 2002). Generalmente, unos altos niveles de variabilidad en la susceptibilidad basal entre poblaciones reflejan una mayor capacidad para el desarrollo de la resistencia. Numerosos autores han publicado trabajos que ponen de manifiesto diferencias en la susceptibilidad basal en numerosas especies de insectos plagas, como por ejemplo *S. exigua* (Hernández-Martínez *et al.*, 2008), *S. frugiperda* (Monnerat *et al.*, 2006), *P. xylostella* (González-Cabrera *et al.*, 2001), *T. ni* (Estada y Ferré, 1994; Iracheta *et al.*, 2000), *H. armigera* (Brévault *et al.*, 2009), *Ostrinia furnacalis* (He *et al.*, 2005) y *O. nubilalis* (Siegfried *et al.*, 2001; Reed y Halliday, 2001). De todas formas, una variabilidad pequeña en la susceptibilidad basal entre poblaciones no siempre conlleva un bajo potencial de desarrollo de resistencia bajo presión selectiva. Por ejemplo, cinco poblaciones de *O. nubilalis* recolectadas en EEUU presentaban pequeñas diferencias (1,9 veces) en la susceptibilidad basal y en cambio respondieron rápidamente a una selección intensa con Dipel ES (Huang *et al.*, 1997). Eso podría ser debido a la existencia de variabilidad en susceptibilidad dentro de cada una de las poblaciones, aunque no emergieran diferencias significativas entre las poblaciones (Ferré y Van Rie, 2002). La determinación de la susceptibilidad basal de diferentes poblaciones de campo de insectos plaga procedentes de diferentes áreas es fundamental para los programas de manejo de la resistencia, ya que es una información esencial para poder predecir y controlar la aparición de cambios en la susceptibilidad que pueden ser provocados por el cultivo de las plantas Bt.

La herencia de la resistencia a las toxinas Cry de *B. thuringiensis* se ha caracterizado en diferentes colonias de laboratorio resistentes, mediante cruces entre individuos resistentes y susceptibles y bioensayos con larvas de las generaciones F₁, F₂ y procedentes de cruces prueba. En general, los resultados de estos tipos de ensayos ha indicado que la resistencia es frecuentemente recesiva (parcialmente o totalmente según los casos) y de carácter autosómico (Ferré y Van Rie, 2002; Heckel *et al.*, 2007). Estudios con colonias resistentes de *O. nubilalis* y *Diatrea saccharalis* han mostrado que el nivel de dominancia/recesividad del rasgo dependía de la concentración de toxina utilizada en los bioensayos, ya que la dominancia aumentaba con la disminución de la concentración de la proteína

Cry1Ab (Alves *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Sin embargo, también se han descrito casos de resistencia dominante incompleta (Gould *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1999a; Sayyed *et al.*, 2005) o semi-dominante (Kranthi *et al.*, 2006). En la mayor parte de los estudios la resistencia se ha asociado a un solo *locus* o a una serie de *loci* estrechamente ligados (Ferré y Van Rie, 2002), aunque se han publicado excepciones como la resistencia a la proteína Cry1Ab en *O. nubilalis* (Alves *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2009), la resistencia a Cry1Ab y Cry1Ac en las colonias Cry1Ab-SEL y Cry1Ac-SEL de *P. xylostella* (Sayyed *et al.*, 2005), la resistencia a *B. thuringiensis* var. *kurstaki* en *T. ni* (Janmaat *et al.*, 2004) y la resistencia a Cry1Ac en *H. armigera* (Kaur y Dilawari, 2011).

La estimación de la frecuencia inicial de los alelos de resistencia en poblaciones de campo es un elemento clave en la predicción de la velocidad de evolución de la resistencia bajo presión selectiva (Ferré y Van Rie, 2002). El riesgo de una adaptación rápida de las plagas a los insecticidas basados en *B. thuringiensis* es altamente dependiente de la frecuencia inicial de los alelos de resistencia, ya que estos pueden ser seleccionados en campo aumentando su frecuencia cuando el agente selectivo es aplicado. El manejo de la resistencia se basa en la determinación de la frecuencia inicial de las variantes alélicas de la resistencia y en el posterior seguimiento en las poblaciones expuestas al insecticida. Una estima indirecta de esta frecuencia alélica puede realizarse con experimentos de selección de laboratorio, ya que se puede asumir que ninguna mutación ocurre después del comienzo de la selección, por lo que por lo menos una copia de un alelo de resistencia tenía que estar presente en los individuos que se utilizaron para establecer la colonia. Esa manera de proceder conlleva errores experimentales que acaban en una sobrestimación de los alelos de resistencia porque se tienen en cuenta solamente los experimentos de selección que tuvieron éxito (Ferré y Van Rie, 2002). La primera aproximación directa para el establecimiento de la frecuencia de los alelos de resistencia fue propuesta en 1997 por Gould y colaboradores que cruzaron individuos de *H. virescens* recolectados en campo y hembras de una colonia resistente para generar progenies híbridas F₁ y F₂ las cuales se utilizaron para ensayos con la proteína Cry1Ac. El resultado de este tipo de rastreo indicó una frecuencia de los alelos de resistencia presentes en campo de $1,5 \times 10^{-3}$. La gran limitación de este método es que se necesita una población resistente disponible para los cruces, y que solamente permite la detección de alelos situados en el mismo *locus* del alelo responsable de la resistencia en la población de laboratorio. En 1998, Andow y Alstad, basándose en sistemas clásicos de aislamiento de mutaciones recesivas, propusieron un método de rastreo de la generación F₂ procedente de

líneas isogénicas fundadas por hembras recolectadas en campo (Figura 12). Este método, denominado “F₂ screen”, es altamente sensible y no necesita de una colonia resistente de laboratorio, por lo que ha sido ampliamente utilizado para la determinación de la frecuencia de los alelos de resistencia en diferentes especies, tanto para establecer frecuencias iniciales como para el seguimiento de la evolución de la resistencia tras la introducción de las plantas Bt.

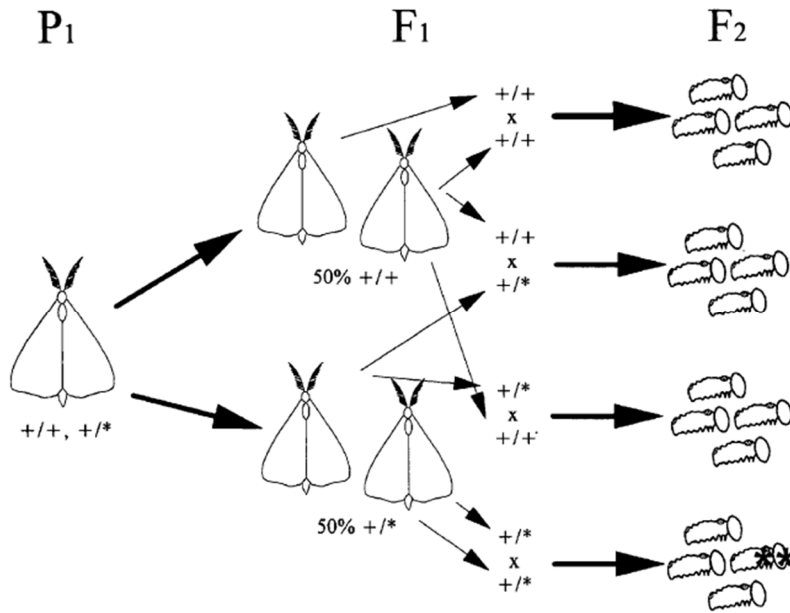


Figura 12. Esquema “F₂ screen”. La generación P₁ está compuesta por hembras fecundadas capturadas en campo. Aquí se representa una hembra portadora de un alelo de resistencia (*) y tres alelos silvestres. La generación F₁ es cruzada masivamente para obtener la generación F₂, utilizada en los bioensayos con las proteínas Cry. En la generación F₂ proveniente de una hembra portadora de un alelo (*), 1/16 de las larvas será homocigota (***) y sobrevivirá al bioensayo (Andow y Alstad, 1998).

Los valores de frecuencia alélica obtenidos con el método F₂ screen varían en función de la población empleada, aunque en casi todos los casos, la frecuencia inicial de los alelos de la resistencia ha demostrado ser baja (menor de 10⁻³). Por ejemplo, para una población española del taladro del maíz *Sesamia nonagrioides* los valores de frecuencia alélica de la resistencia a la proteína Cry1Ab fueron menores de 8,6 x 10⁻³, muy similares a aquellos obtenidos para una población griega (menores de 9,7 x 10⁻³) (Adreadis *et al.*, 2007). En otro taladro del maíz, *O. nubilalis*, ningún alelo mayor de resistencia ha sido detectado hasta el día de hoy y su frecuencia alélica gen ha sido calculada como menor de 10⁻³, a pesar de que se han llevado a cabo repetidos rastreos de alelos recesivos tanto con poblaciones estadounidenses como europeas, así como con poblaciones procedentes de áreas

cultivadas con maíz Bt y de área a donde el cultivo de las plantas transgénica no está permitido (Andow y Alstad, 1998; Andow *et al.*, 2000; Bourguet *et al.*, 2003; Stodola *et al.*, 2006; Engels *et al.*, 2010). La frecuencia de los alelos de resistencia a la proteína Cry1Ab, para una población de *H. virescens* de EEUU, diez años después de la introducción del algodón Bt, resultaron estar comprendidos entre $2,6 \times 10^{-2}$ y $3,6 \times 10^{-3}$ (Blanco *et al.*, 2009). En poblaciones australianas de *H. armigera* y *Helicoverpa punctigera*, tras la introducción del algodón Bt, se llevaron a cabo rastreos anuales para estimar la frecuencia de los alelos de resistencia a las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab. Los resultados publicados hasta ahora para *H. armigera* revelan una baja frecuencia de los alelos de resistencia a las proteínas Cry1Ac (menor de 3×10^{-4}) y Cry2Ab ($3,3 \times 10^{-3}$) (Mahon *et al.*, 2007) pero en *H. punctigera* se ha detectado un aumento de la frecuencia de los alelos de resistencia a Cry2Ab de $1,8 \times 10^{-3}$ (para la temporada 2004-2007) a $1,2 \times 10^{-2}$ (para la temporada 2008-2009) (Downes *et al.*, 2010). El mismo aumento de la frecuencia de los alelos de resistencia, aunque no asociado a una disminución de la efectividad de las plantas Bt en el control de las plagas, se ha detectado en poblaciones de campo de *H. armigera* de la región china de Qiuxian, controladas por el algodón Bt. Los valores obtenidos fueron de $5,8 \times 10^{-3}$ en 1999 (He *et al.*, 2001), de $1,5 \times 10^{-2}$ en la temporada 2003-2005 (Xu *et al.*, 2009) y de $7,5 \times 10^{-2}$ en 2007 (Liu *et al.*, 2010b). Sin embargo, la frecuencia de los alelos de resistencia a la proteína Cry1Ac en otras regiones chinas a donde se cultiva algodón Bt se estimó menor de 3×10^{-4} , para insectos recolectados en la temporada 2006-2008 (Gao *et al.*, 2009).

Otro factor importante es la contribución relativa de los genes a la variabilidad de un carácter. En muchos casos, aunque se haya demostrado la contribución de un solo gen a la resistencia, una parte de la variación genética resulta de la acción de *loci* modificadores (Firko y Hayes, 1990) y la estimación de la heredabilidad puede darnos indicaciones sobre el rol del componente genético en la variabilidad del fenotipo de la resistencia en una población objeto de estudio. La heredabilidad es importante porque determina con qué ritmo se modifica la media poblacional, y cómo evoluciona la población, en respuesta a selección natural o artificial. La heredabilidad en sentido amplio (H^2) representa la proporción de la variación total fenotípica determinada por la varianza genotípica; es decir, incluye los efectos de la varianza por dominancia y de la varianza epistática (Firko y Hayes, 1990). La heredabilidad en sentido estricto (h^2) mide la proporción de la varianza fenotípica total que está determinada por la varianza genética aditiva y representa la causa del parecido fenotípico entre parientes. Estimaciones de la h^2 se pueden obtener también mediante los resultados obtenidos durante el proceso de selección

(llamada en este caso heredabilidad realizada) (Falconer y Mackay, 1996) y en numerosos casos este método se ha aplicado a estudios de la resistencia a *B. thuringiensis* en diferentes plagas de lepidópteros (Tabashnik, 1994; Huang *et al.*, 1999b; Ferré y Van Rie, 2002; Hernández-Martínez, 2009).

La estabilidad de la resistencia viene determinada por la eficacia biológica que confiere a los individuos el poseer uno o varios genes de resistencia. Es un parámetro fundamental para diseñar estrategias de manejo basadas en la rotación de insecticidas o plantas que expresan diferentes proteínas Cry. En la mayoría de los casos observados, la resistencia a *B. thuringiensis* no es estable y revierte una vez la presión de selección termina (Ferré y Van Rie, 2002; Gassmann *et al.*, 2009) aunque se han observado casos donde el nivel de resistencia no disminuye (McGaughey, 1985; Liu *et al.*, 1996). Diferentes estudios han asociado la resistencia a los productos de *B. thuringiensis* a una menor eficacia biológica de los individuos resistentes (Bird y Akhurst, 2004; Bird y Akhurst, 2005; Anilkumar *et al.*, 2008) de tal forma que ésta podría ser la causa de la pérdida de la resistencia en ausencia de presión selectiva.

1.5.2.1 Identificación de los genes de resistencia

Los mapas de ligamiento basados en marcadores moleculares que cubren enteramente el genoma de diferentes especies de lepidópteros se han empleado para asociar la resistencia a *B. thuringiensis* a grupos de ligamiento, para luego poder llegar a la identificación de los genes responsables sin necesitar ninguna hipótesis sobre el mecanismo que está en la base de la resistencia misma. Aunque estos ensayos son fundamentales en la identificación de los genes involucrados, la comprensión total del fenómeno de la resistencia solamente se puede lograr después de haber aclarado también el mecanismo bioquímico (Heckel *et al.*, 2007). Este tipo de aproximación permitió cartografiar el gen *BtR-4*, responsable de la resistencia en la cepa YHD2 de *H. virescens*, en el grupo de ligamiento 9 (Heckel *et al.*, 1997). Más tarde *BtR-4* se identificó como el gen codificante para la caderina de 12 dominios el cual resultó estar interrumpido en la cepa YHD2 por la inserción de un transposón (Gahan *et al.*, 2001). Mutaciones parecidas en el gen de la caderina se descubrieron posteriormente en cepas resistentes de otras especies como *P. gossypiella* y *H. armigera* (Morin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005) y mediante análisis de ligamiento, se asociaron genéticamente a la resistencia. En otra cepa resistente de *H. virescens*, CP73, la resistencia a la proteína Cry1Ac se asoció al gen *BtR-5* el cual pertenece al grupo de ligamiento 10 mientras que la resistencia a la proteína Cry2Aa no resultó estar determinada por el mismo gen, si no por una combinación

de varios genes cada uno de los cuales producía un pequeño efecto (Gahan *et al.*, 2005). En 2010, mediante análisis de ligamiento se ha identificado en la cepa YHD3 (procedente de re-selección de la cepa YHD2) un nuevo gen de resistencia llamado *BtR-6*, asociado al grupo de ligamiento 2 (Gahan *et al.*, 2010). Tras clonación posicional, el gen *BtR-6* se ha identificado como el gen *abcc2*, codificante para un transportador del tipo ABC, y se ha detectado una delección de 22 pb en su secuencia en todos los individuos resistentes. Otras pruebas que implican al gen *abcc2* en la resistencia vienen de un estudio (Baxter *et al.*, 2011) con dos especies que han desarrollado resistencia a *B. thuringiensis* en campo, *P. xylostella* (colonia NO-QAGE) y *T. ni*. Mediante cartografiado, en ambos casos se pudo asociar al gen *abcc2* a la resistencia. Mientras que en *T. ni* la causa de la alteración de *abcc2* permanece aún por aclarar, en los individuos resistentes de *P. xylostella* todas las copias de *abcc2* presentaban una delección de 30 pb que provocaba una terminación prematura de la proteína correspondiente. Recientemente, la resistencia a la toxina Cry1Ab en *B. mori* ha sido también asociada a una mutación en el gen codificante para un transportador ABC, y en este caso la mutación responsable ha sido caracterizada como la inserción de un codón que codifica para una tirosina (Atsumi *et al.*, 2012).

Los mapas genéticos se han utilizado también para estudiar la contribución de genes que se habían descrito como “genes candidatos de resistencia” en la resistencia de ciertas cepas tras análisis bioquímicos (Heckel *et al.*, 2007). En *P. xylostella*, se cartografiaron diferentes genes “candidatos de resistencia” en las cepas NO-QA y SCI cuyos genes de resistencias son alélicos (Baxter *et al.*, 2005). Mientras que la resistencia se asoció al grupo de ligamiento 22, ninguno de los 12 genes estudiados (entre ellos los genes codificantes para la caderina, siete APN, la ALP, una mucina, la glicoproteína p252 y un homólogo de *bre2*) se asignó a este mismo grupo de ligamiento (Baxter *et al.*, 2005; 2008). De la misma forma, el cartografiado de la resistencia a la proteína Cry1F en *O. nubilalis* situó el *locus* responsable de la resistencia en el grupo de ligamiento 12, que no cosegregó con los genes codificantes para la caderina, las APN1 y APN3 y la ALP (Coates *et al.*, 2011). Otras técnicas de ligamiento genético se han utilizado para correlacionar la resistencia a *B. thuringiensis* con proteínas previamente descritas como posibles responsables de la resistencia. Utilizando un análisis molecular con aloenzimas distintivas entre una cepa resistente y una susceptible de *P. interpunctella*, en 1997 Oppert y colaboradores encontraron las primeras evidencias genéticas de ligamiento de la resistencia a *B. thuringiensis* con una proteína del intestino, en aquel caso una proteasa involucrada en la activación de las protoxinas. Recientemente, en una

población de *T. ni* seleccionada en invernaderos, se ha asociado la expresión reducida del gen de la APN1 con la segregación de la resistencia a la proteína Cry1Ac (Tiewsiro y Wang, 2011). La progenie de dos cruces prueba, resultante de cruces iniciales recíprocos entre una cepa resistente y una susceptible, se sometió a selección con la proteína Cry1Ac. El análisis de los transcritos reveló que la progenie no tratada se podía agrupar en dos grupos distintos según los niveles de expresión de *apn1* (expresión normal y expresión reducida) en una proporción de 1:1 mientras que la progenie seleccionada con la proteína Cry1Ac exhibía solamente un nivel de expresión reducido de *apn1*.

1.5.3 Mecanismos de resistencia

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso complejo, compuesto por numerosos pasos que finalmente producen la muerte del insecto. En teoría, la modificación de cualquiera de estos pasos puede causar resistencia a las proteínas Cry (Figura 13) (Griffitts y Aroian, 2005; Ibrahim *et al.*, 2010), así como demuestran las diferentes colonias resistentes seleccionadas en diferentes especies de lepidópteros, coleópteros, dípteros y nematodos.

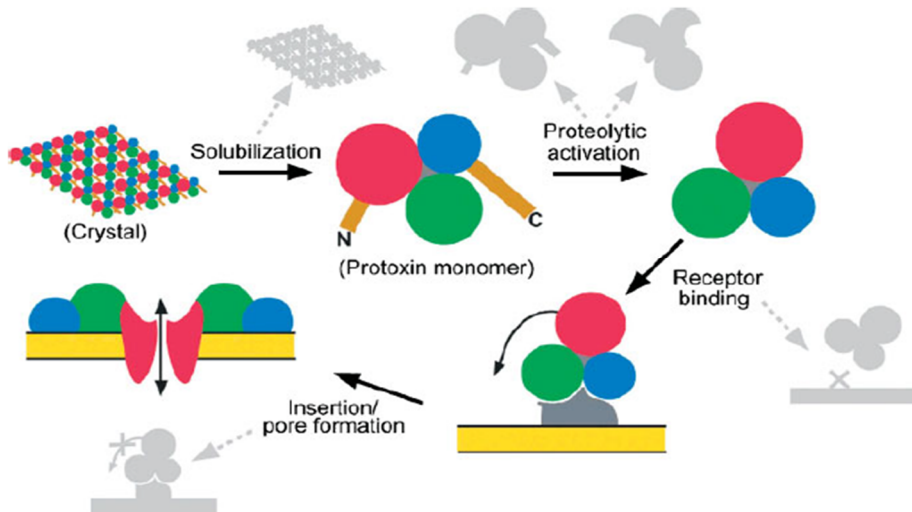


Figura 13. Modo de acción de las toxinas Cry y posibles mecanismos de resistencia. Las flechas negras indican los pasos secuenciales (resumidos) que se han descrito en el modo de acción de las proteínas Cry mientras que las flechas grises indican los fallos en el modo de acción que pueden resultar en la aparición de resistencia (Griffitts y Aroian, 2005).

En general, el mecanismo de resistencia más común es una alteración de la unión de las proteínas Cry a los receptores situados en la superficie de las células epiteliales y, de hecho, este es el único mecanismo que ha sido descrito en casos de resistencia surgida en campo. Otro mecanismo de resistencia caracterizado es la

modificación de las proteasas intestinales responsables de la activación proteolítica. Por último, la activación del sistema inmune y el aumento en la producción de las esterases han sido también relacionados con la resistencia.

1.5.3.1 *Modificación de los sitios de unión de las proteínas Cry a la membrana epitelial*

El primer estudio que mostró una alteración de la unión de las toxinas Cry a las membranas de las células epiteliales se realizó con una cepa de *P. interpunctella* resistente a la proteína Cry1Ab (Van Rie *et al.*, 1990b). Posteriormente, varios autores llegaron a conclusiones similares con otras cepas resistentes de diferentes especies de lepidópteros, en las que los insectos mostraban una alteración en la unión de las proteínas Cry tóxicas para las larvas sensibles. Así, se ha descrito en *P. xylostella* (Ferré *et al.*, 1991; Tabashnik *et al.*, 1997; Ballester *et al.*, 1999; Sayyed *et al.*, 2005), *T. ni* (Wang *et al.*, 2007), *H. virescens* (Lee *et al.*, 1995; Jurat-Fuentes *et al.*, 2002; 2003), *H. armigera* (Akhurst *et al.*, 2003; Xu y Wu, 2008; Caccia *et al.*, 2010), *H. punctigera* (Caccia *et al.*, 2010), *O. nubilalis* (Siqueira *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2011) y *P. gossypiella* (González-Cabrera *et al.*, 2003). En muchos de estos estudios se ha analizado el patrón de unión de las proteínas Cry en cepas resistentes seleccionadas con una sola proteína Cry y que mostraban resistencia cruzada a otras toxinas. La definición de resistencia cruzada se refiere a la situación en la cual una cepa que desarrolla resistencia a un insecticida a la vez desarrolla resistencia a otros insecticidas a los cuales no ha sido expuesta (Yu, 2008). Los resultados de los estudios han mostrado que los patrones de resistencia cruzada a las proteínas Cry coinciden con aquellas proteínas que comparten el mismo sitio de unión y que por tanto parecen poseer el mismo modo de acción (Ferré y Van Rie, 2002).

La caracterización de la unión de las proteínas Cry a cepas resistentes ha llevado a la definición de la "Resistencia de tipo 1" la cual parece ser la más habitual aunque no la única en Lepidóptera. Este tipo de resistencia se caracteriza por altos niveles de resistencia al menos a una de las toxinas de la clase Cry1A, ninguna resistencia cruzada a la proteína Cry1C, unión reducida a, por lo menos, una de las proteínas de la clase Cry1A y herencia recesiva del carácter (Tabashnik *et al.*, 1998).

En algunas cepas resistentes de *H. virescens*, *P. gossypiella* y *H. armigera* la resistencia de "tipo 1" se asoció a mutaciones en el gen de la caderina (Bravo y Soberón, 2008), pero a nivel general sigue siendo difícil identificar cual es la molécula responsable de las alteraciones de la unión (Griffitts y Aroian, 2005;

Heckel *et al.*, 2007). Nuevas pruebas que inciden en el rol fundamental de la caderina en la resistencia vienen del estudio de individuos resistentes de *D. saccharalis* (cuyo mecanismo de resistencia no ha sido aún caracterizado) que tienen niveles de expresión reducidos de la caderina respecto a las larvas susceptibles (Yang *et al.*, 2011). Otra serie de resultados que confirman esta hipótesis fueron obtenidos en diferentes ensayos de susceptibilidad con unas proteínas genéticamente modificadas, llamadas Cry1AbMod y Cry1AcMod, que no necesitan el paso de unión a la caderina para poder oligomerizar y que, por tanto, se supone que pueden sobrepasar la resistencia dependiente de la caderina. Los resultados indicaron que estas toxinas son capaces de matar a larvas de *P. gossypiella* cuya resistencia se ha caracterizado por ser debida a mutaciones en el gen de la caderina (Soberón *et al.*, 2007). Por otra parte, estas toxinas también son tóxicas para una población resistente de *T. ni* (Franklin *et al.*, 2009) cuya resistencia se debe a una alteración de la unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac (Wang *et al.*, 2007) y cuyo fenotipo segrega con el gen *abcc2* (Baxter *et al.*, 2011). Un estudio reciente (Tabashnik *et al.*, 2011) ha demostrado que las proteínas Cry1AMod especificadas anteriormente son muchos más activas que las toxinas silvestres frente a cepas resistentes de *P. xylostella* (cepa NO-QAGE) y *O. nubilalis*, en las cuales se ha descrito una alteración de la unión de las proteínas Cry1A (Tabashnik *et al.*, 1997; Siqueira *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2011) que no ha sido relacionada en ningún caso con la caderina (Baxter *et al.*, 2005; Bel *et al.*, 2009; Khajuria *et al.*, 2011). En *H. virescens*, se seleccionaron dos cepas procedentes de la colonia YHD3 cuya resistencia a la proteína Cry1Ac está genéticamente ligada a la caderina y al transportador ABCC2. Cada una de estas cepas lleva solamente el gen mutado codificante para la caderina o el gen mutado para el transportador ABCC2. Los análisis de unión de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a las membranas epiteliales intestinales de las larvas de las tres colonias han demostrado que la mutación en la caderina es responsable de la falta de unión de la proteína Cry1Aa, mientras que la mutación en el transportador ABCC2 es responsable de la alteración de la unión de Cry1Ab y Cry1Ac (Gahan *et al.*, 2010).

Otras moléculas descritas como receptores para las proteínas Cry son proteínas con anclaje GPI como las APN y las ALP. Mutaciones o reducciones de los niveles de expresión de las APN han sido relacionados con la resistencia de algunas cepas: Herrero *et al.* (2005) describieron una cepa de *S. exigua* resistente a la proteína Cry1C en la cual no pudieron detectar la expresión de la APN1. Más recientemente, otras dos colonias resistentes, de *O. nubilalis* (Khajuria *et al.*, 2011) y de *D. saccharalis* (Yang *et al.*, 2010), mostraron una reducción en los niveles de

expresión de unas aminopeptidasas. En una colonia resistente a la proteína Cry1Ac de *H. armigera* se encontró una delección en el gen codificante para la APN1 (Zhang *et al.*, 2009), aunque no se realizó el estudio de genotipado para asociarlo genéticamente con la resistencia. Con respecto a las ALP, se ha observado que en ciertas cepas resistentes de *H. virescens*, *H. armigera* y *S. frugiperda* no se ha detectado una disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina en las vesículas de membrana epitelial pero ninguna variación de la actividad aminopeptidásica. Este descenso ha sido relacionado con una reducción de los niveles de transcritos de los genes codificantes para las ALP en las cepas resistentes (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011).

1.5.3.2 Alteración del procesado proteolítico

La activación de las proteínas Cry por proteasas intestinales del intestino de las larvas es uno de los primeros pasos imprescindibles descritos en el mecanismo de acción. La alteración de este proceso se describió por primera vez en una cepa resistente de *P. interpunctella* (Oppert *et al.*, 1994) y fue asociada a la falta de una proteasa intestinal en las larvas resistentes (Oppert *et al.*, 1997). Cuando esta cepa fue alimentada con una proteína activada *in vitro* se observó una disminución de la resistencia de un factor 11, apoyando la teoría de que la resistencia era debida a un fallo en la activación (Herrero *et al.*, 2001). También la resistencia de una colonia de *O. nubilalis* al producto comercial Dipel ES se relacionó con una actividad reducida de las proteasas (Huang *et al.*, 1999c; Li *et al.*, 2004b). Alteraciones en la activación de las protoxinas fueron evidenciados para cepas resistentes de *H. virescens* (Forcada *et al.*, 1996; 1999) y *H. armigera* (Chandrashekar y Gujar, 2004; Rajagopal *et al.*, 2009) mientras que la ratio de resistencia entre una cepa resistente y una sensible de *P. xylostella* se redujo utilizando una toxina activada respecto a la protoxina (Sayyed *et al.*, 2001). En general, se considera que este mecanismo de resistencia no es relevante en lo que respecta a la utilización de las plantas Bt, porque éstas expresan las proteínas Cry en la forma activada, eludiendo de esta manera el paso de proteólisis.

1.5.3.3 Otros mecanismos

Además de los mecanismos de resistencia citados anteriormente, varios autores han sugerido otros mecanismos menos frecuentes, como el secuestro de las proteínas Cry por acción de las esterases (Gunning *et al.*, 2005; Sayyed *et al.*, 2008). Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado por su implicación en la resistencia a insecticidas químicos. Otros mecanismos relacionados con la resistencia son la activación constitutiva del sistema inmune en cepas resistentes (Rahman *et al.*,

2004; Ma *et al.*, 2005; Hernández-Martínez *et al.*, 2010), el incremento de la tasa de reparación celular (Forcada *et al.*, 1999; Martínez-Ramírez *et al.*, 1999) y el aumento de la actividad antioxidante (Candas *et al.*, 2003).

1.5.3.4 Mecanismos múltiples de resistencia

Muchos modelos teóricos han descrito la aparición de la resistencia considerando una herencia monogénica del rasgo aunque varios resultados obtenidos mediante diferentes aproximaciones han mostrado que una misma población de insecto puede tener diferentes mecanismos de resistencia (Ferré y Van Rie, 2002). Por ejemplo, la colonia YHD3 de *H. virescens* (resistente a la proteína Cry1Ac y en la cual se han caracterizado mutaciones en los genes *abcc2* y *cdh* ligadas a la resistencia y que alteran la unión de las proteínas Cry1A; Gahan *et al.*, 2010) también muestra una disminución en los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011). También, se ha detectado una reducción en los niveles de expresión de la fosfatasa alcalina en otras cepas (CXC y KCBhyb) de la misma plaga, *H. virescens*, resistentes a las proteínas Cry1Ac y Cry2Aa, en las cuales el patrón y el mecanismo de resistencia parecen diferentes del estudiado en la colonia YHD3 (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011). En CXC, la resistencia no se debe a ninguna alteración en la unión de las proteínas Cry1A mientras que en KCBhyb se detectó una disminución de la unión de la proteína Cry1Aa (Jurat-Fuentes *et al.*, 2003). En ambas cepas se han sugerido otros mecanismos de resistencia como una alteración en la proteólisis de las protoxinas (Forcada *et al.*, 1996; 1999) y mayor capacidad de recuperación del daño celular provocado por las proteínas Cry (Forcada *et al.*, 1999; Martínez-Ramírez *et al.*, 1999). En una colonia resistente de *P. xylostella*, la resistencia a Cry1Ab segregó de forma independiente de la resistencia a Cry1C (Liu y Tabashnik, 1997) y resultados parecidos se obtuvieron en otras colonias resistentes de *P. xylostella* (Tabashnik *et al.*, 1997). Otras evidencias de la aparición de múltiples mecanismos de resistencia vienen de una colonia resistente de *P. interpunctella*. Primero se asoció la resistencia a la pérdida de una proteasa intestinal (Oppert *et al.*, 1997), luego se evidenció una alteración de la unión de la toxina Cry1Ab a la membrana del epitelio intestinal (Herrero *et al.*, 2001) y finalmente, utilizando una aproximación proteómica, se evidenció un aumento del metabolismo oxidativo de las larvas resistentes (Candas *et al.*, 2003).

1.5.4 Manejo de la resistencia

La entrada en el mercado de los cultivos Bt ha impulsado el desarrollo de diferentes estrategias para retrasar la aparición de la resistencia en los insectos plaga (Gould, 1998; Bates *et al.*, 2005; Ferré *et al.*, 2008). Los cultivos Bt conllevan un

riesgo mayor de que surjan casos de resistencia respecto a las aplicaciones de formulados basados en Bt, por el hecho de que las proteínas Cry se expresan constantemente durante toda la temporada de cultivo, aumentando así la presión de selección. La estrategia de manejo de la resistencia que se está empleando desde la introducción de las plantas Bt se basa en el cultivo en paralelo de plantas que expresan altas dosis de proteínas Cry junto con zonas refugio con plantas no transgénicas (Roush, 1994). Esta estrategia de zonas refugios de plantas no-Bt al lado de los campos Bt sirve para promover la proximidad de insectos susceptibles junto a los campos Bt donde podría seleccionarse una población resistente. El apareamiento casual entre individuos susceptibles e individuos resistentes daría lugar a una progenie heterocigota, que teóricamente no puede sobrevivir a la alta dosis de proteínas Cry producida por las plantas Bt (Figura 14). Para que esta estrategia sea efectiva, la resistencia tiene que ser funcionalmente recesiva para la dosis de toxina expresada por las plantas. Además, la frecuencia de los alelos de resistencia en el campo ha de ser baja (menor de 10^{-3}) para que sea extremadamente improbable el apareamiento entre dos individuos resistentes (Roush, 1994; Gould, 1998). Esta estrategia ha resultado ser efectiva hasta el día de en el control de la resistencia hoy (Huang *et al.*, 2011; Siegfried y Hellmich, 2012) pero presenta algunas desventajas que hacen que no sea totalmente ideal para la preservación a largo plazo de la susceptibilidad de los insectos plagas. Por ejemplo, los diferentes tiempos de desarrollo que pueden tener insectos susceptibles y resistentes podría comprometer el apareamiento aleatorio entre ellos. También la presencia de múltiples insectos diana de la misma planta Bt, cada uno con una susceptibilidad diferente a la toxina Cry expresada, podría resultar en un fallo en la asunción de la resistencia funcionalmente recesiva (Bates *et al.*, 2005; Ferré *et al.*, 2008).

Junto a la estrategia de la “alta dosis-refugio”, se está empleando una segunda táctica que es la de utilizar plantas Bt que expresan más de una proteína de *B. thuringiensis*. Ésta está basada sobre el concepto de que la probabilidad de la aparición de resistencia a dos proteínas conferida por dos genes independientes es el producto de las probabilidades de la aparición de resistencia a cada una de ellas por separado. También permite ampliar el abanico de especies controladas. Para que esta estrategia sea efectiva las toxinas expresadas por la misma planta no tienen que generar resistencia cruzada en los insectos diana (Bates *et al.*, 2005; Ferré *et al.*, 2008).

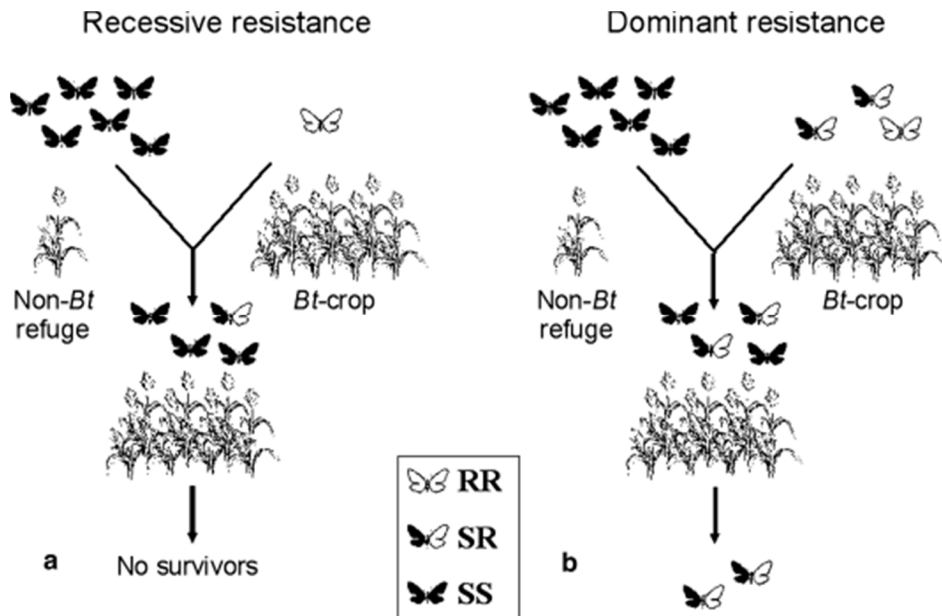


Figura 14: Esquema de la estrategia “alta dosis-refugio”. (a) Resistencia recesiva, (b) resistencia dominante (Ferré *et al.*, 2008).

1.6 *Ostrinia nubilalis* (HÜBNER, 1796)

1.6.1 Distribución y biología

El lepidóptero *O. nubilalis*, comúnmente llamado taladro del maíz, pertenece a la familia de los Crambidae y es uno de los fitófagos más importantes en los campos de maíz de los climas templados. Está ampliamente distribuido en Europa así como en las regiones centrales y occidentales de Asia, en Rusia y en el norte de África. A comienzos de 1900 fue introducido accidentalmente en EEUU con la exportación de sorgo europeo y hoy en día es una plaga muy difundida en todo el este del continente norte americano. Es una especie altamente polífaga que suele alimentarse de maíz, pero que puede causar daños a otros cultivos como pimiento y cáñamo cuando el maíz no está disponible (García Marí *et al.*, 1994). También puede infestar plantas silvestres y malas hierbas como el ajeno o el bledo (Tate *et al.*, 2006). Las larvas excavan galerías en el interior del tallo, destrozando la médula de las plantas y provocando daño y estrés fisiológico que reduce la cosecha. Además, las plantas atacadas se rompen con facilidad por la base.

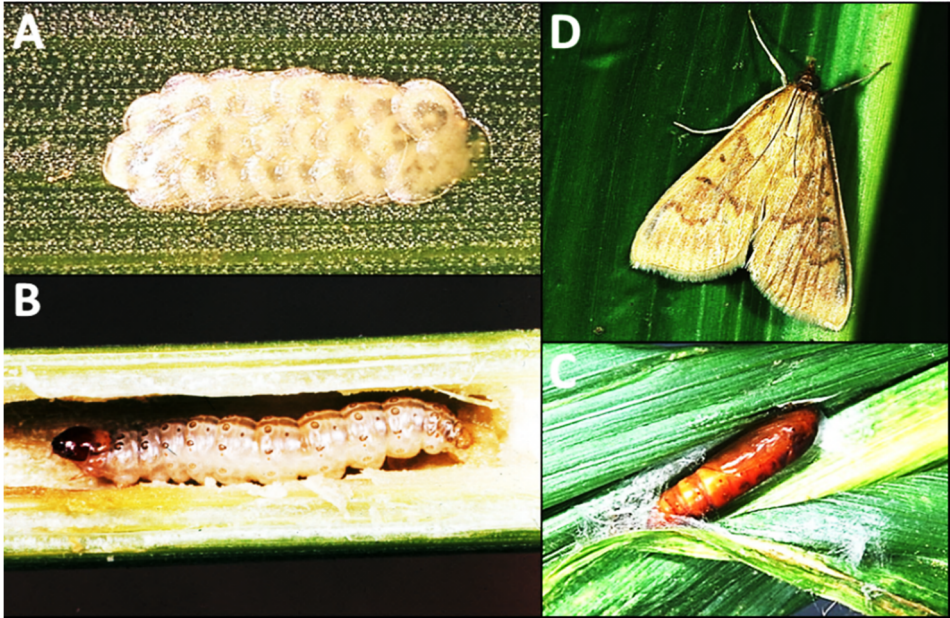


Figura 15: Estadios del ciclo vital de *O. nubilalis*. A) Huevos, B) larva de último estadio, C) pupa o crisálida, D) adulto. Fuente imágenes: A, C y D www.inra.fr, B www.forestpests.org.

En las regiones más frías esta especie tiene una única generación al año mientras que en las regiones mediterráneas puede llegar a tener más de tres generaciones anuales (Velasco *et al.*, 2007). El ciclo de vida de *O. nubilalis* se divide en cuatro fases: huevo, larva (cinco estadios), crisálida y adulto (Figura 15). Los adultos realizan las puestas en la cara inferior de las hojas, en plastones de 15 o 30 huevos. Cada hembra pone una media de 400 huevos, pudiendo llegar en casos particulares hasta el millar. Los huevos tardan en eclosionar de 4 a 9 días y las larvas recién nacidas empiezan a alimentarse primero del parénquima foliar para luego penetrar en el interior del tallo. Las larvas de segunda generación se desarrollan sobretodo en la mazorca del maíz y no tanto en la caña. La fase de larva puede durar entre uno y dos meses. Una vez completados los cinco estadios larvarios, las larvas pupan en el tallo de las plantas y el adulto eclosiona a los 7-15 días. El adulto que emerge puede vivir entre 15 y 25 días. En otoño, en lugar de pupar, las larvas de quinto estadio pertenecientes a la última generación anual se mueven hacia las partes inferiores de las plantas (que quedan en los rastrojos de los maizales después de la recolección) y entran en un estadio de diapausa que les permite sobrevivir al invierno.

1.6.2 Control en el campo

En las áreas con grandes infestaciones de *O. nubilalis*, las pérdidas de cosecha ocasionadas por esta plaga pueden variar del 5 hasta el 30% (Meissle *et al.*, 2011). No obstante, a pesar de que las pérdidas son relevantes, en muchos países no se ponen en práctica medidas de control. La razón es que el control de *O. nubilalis*, así como de otros taladros, depende de un factor importante: esta plaga trascurre la mayor parte del estadio larvario (que es cuando produce el daño a los cultivos) en el interior de los tallos de las plantas cultivadas. Esto complica el control con los insecticidas tradicionales, ya que muchos son efectivos solamente en el tiempo limitado entre la eclosión de los huevos y la entrada de las larvas en el tallo. Los métodos que se están empleando actualmente para el control de *O. nubilalis* son:

- **Métodos de control químico:** Estos medios no son muy empleados en Europa. En países como Francia, Italia o Países Bajos el porcentaje de campos tratados es inferior al 10%. España es el país donde más aplicaciones de insecticidas foliares se hacen para el control de los barrenadores del maíz y como ejemplo, en el Valle del Ebro alrededor del 50% de los campos de maíz son tratados. Normalmente, se emplean insecticidas a amplio espectro como piretroides y organofosforados (Meissle *et al.*, 2010);
- **Métodos de control biológico:** El control biológico se realiza principalmente utilizando himenópteros parasitoides del género *Trichogramma* que parasitan los huevos del taladro del maíz. El país europeo que más utiliza ese método es Francia, a donde cada año los parasitoides se sueltan sobre más de 150 000 hectáreas de campos de maíz (Meissle *et al.*, 2010).
- **Métodos de control físico:** Una medida comúnmente utilizada es la trituration o la destrucción con fuego de los rastrojos, el lugar donde las larvas de *O. nubilalis* pasan el invierno (García Marí *et al.*, 1994). Así, los sistemas de laboreo reducidos al mínimo, que aconsejan dejar los residuos de los cultivos en los campos, aumentan las infestaciones de *O. nubilalis*.

1.6.3 Toxicidad de las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*

Los ensayos de toxicidad frente a las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* han mostrado que esta especie es altamente susceptible a las proteínas Cry de la clase 1 (<http://www.glfc.forestry.ca/bacillus>). La susceptibilidad de *O. nubilalis* frente a las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se ha caracterizado en

diferentes poblaciones y, junto con las toxinas Cry1B y Cry1F, son las proteínas de *B. thuringiensis* más activas para esta especie (Chambers *et al.*, 1991; Denolf *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2005). Otras proteínas de la clase 1 tóxicas pertenecen a las familias Cry1I (Sekar *et al.*, 1997) y Cry1J (Donovan *et al.*, 1994) mientras que entre las proteínas de otras clases se describieron la Cry2Aa (Sims, 1997) y la Cry9C (Reed y Halliday, 2001). A día de hoy no se ha encontrado ninguna toxina Vip altamente tóxica frente *O. nubilalis*.

Los formulados insecticidas basados en *B. thuringiensis* no se emplean prácticamente para el control de esta plaga en los campos de maíz, pues el comportamiento endófito de las larvas hace que el control por *B. thuringiensis* sea poco efectivo. Este hecho ha aumentado el interés por buscar estrategias de control que mejoren la resistencia intrínseca de las plantas frente al insecto.

1.6.4 El maíz Bt en el control de *O. nubilalis*

El maíz Bt es la planta transformada con los genes de *B. thuringiensis* más cultivada en el mundo: en 2011 su cultivo cubrió una superficie de 43,3 millones de hectáreas, frente a 22,8 millones del algodón Bt (James, 2011). Los EEUU, que empezaron a permitir las plantaciones de plantas Bt en 1996, son el país que más maíz Bt siembra y recientemente han llegado a aprobar la comercialización de una nueva variedad (SmartStax™) que expresa una combinación de seis diferentes toxinas de *B. thuringiensis*. En la UE, el país líder en la producción comercial de maíz Bt es España, que permite su cultivo desde 1998. En este país, más de 116 mil hectáreas han sido sembradas con maíz Bt en 2012 (30% del total de la superficie cultivada de maíz), en contraposición con las 17,2 mil hectáreas que sumaron en 2011 los cultivos de los otros países UE que han adoptado el maíz Bt, que son Portugal, República Checa, Polonia, Eslovaquia y Rumania (James, 2011; Ministerio de Agricultura, alimentación y Mediambiente, 2012). Comparado con los 13 millones de hectáreas de maíz cultivados en toda la UE, el porcentaje de adopción del maíz Bt es menor del 1%, aunque en ciertas áreas de España, afectadas por altas infestaciones de plagas del maíz, el nivel de adopción ha llegado al 84% (Meissle *et al.*, 2010).

Se han comercializado tres tipos de maíz Bt: resistentes a taladros, resistentes al coleóptero *Diabrotica virginiifera* y resistentes a ambas plagas. Los resistentes a taladros son los que ocupan mayor superficie y actualmente la mayoría de estas plantas están transformadas con el gen de la toxina Cry1Ab. El único evento aprobado para el cultivo en la UE (MON810) también expresa esta proteína.

Más de doscientas variedades derivadas del evento MON810 están inscritas en el catálogo común de variedades de especies de plantas agrícolas de la UE. Hasta 2005 se permitió el cultivo de otras variedades Bt, derivadas del evento Bt-176, que más tarde fueron retiradas del mercado ya que incluían un gen de resistencia a ampicilina y además no expresaban la proteína Cry1Ab constantemente durante todo el ciclo de la planta (Fearing *et al.*, 1997). Otros eventos de transformación, que expresan las toxinas Cry1Ab o Cry1F, activas frente a *O. nubilalis*, o las toxinas Cry3Bb1, mCry3A o Cry34Ab1/Cry35Ab1, tóxicas para *D. virginifera*, han sido presentados a la UE y están pendientes de la aprobación para su cultivo (Tabla 2).

La adopción del maíz Bt, a diferencia de las variedades convencionales, permite a los agricultores mayores rendimientos por hectárea en caso de ataque, que se traducen en mayores remuneraciones económicas. Esto es particularmente verdadero en presencia de fuertes infestaciones de *O. nubilalis*, cuando el control altamente efectivo ejercido por el maíz Bt agudiza las diferencias respecto al maíz convencional (Gómez-Barbero *et al.*, 2008). En EEUU, donde *O. nubilalis* es una plaga capaz de causar pérdidas de mil millones de dólares cada año, la adopción del maíz Bt (el 63% del total en 2009) produjo una disminución significativa de las poblaciones de esta plaga (Hutchison *et al.*, 2010). La expresión de las toxinas Cry en todos los tejidos de la planta y a lo largo de toda la temporada hace que la planta esté constantemente protegida frente a los ataques de *O. nubilalis* y que no sea necesario el control con otros productos. En España, los agricultores que cultivan maíz convencional aplican una media de 0,86 tratamientos insecticidas por año, mientras que quien cultiva maíz Bt aplica 0,32 tratamientos anuales (Gómez-Barbero *et al.*, 2008). En una escala global, el cultivo de maíz Bt desde 1996 hasta 2008 ha implicado una reducción de la utilización de ingredientes activos insecticidas del 35% (Brookes y Barfoot, 2010).

Los daños causados por los taladros que se alimentan de las plantas de maíz a menudo favorecen el desarrollo de hongos fitopatógenos, entre los cuales, los más peligrosos, pertenecen al género *Fusarium*. El mayor problema correlacionado con la presencia de hongos del género *Fusarium* es la producción de micotoxinas que pueden dar lugar a intoxicaciones crónicas o agudas en humanos o en el ganado. La UE ha establecido valores máximos de tolerancia de ciertas micotoxinas para el maíz destinado a la alimentación humana de la misma forma que existen valores límites para el maíz destinado al ganado. El hecho de que el maíz Bt sufra menos daños provocados por *O. nubilalis* respecto al maíz convencional tiene como

ventaja adicional la reducción de las oportunidades de los hongos del género *Fusarium* de entrar en las plantas (Folcher *et al.*, 2010).

Tabla 2: Eventos de maíz Bt que han sido aprobados o están pendiente de aprobación para el cultivo en la UE. Datos adaptados de Meissle *et al.* (2011).

Evento	Gen	Orden diana	Compañía	Estado ^a	Año solicitud
MON810	<i>cry1ab</i>	Lepidóptera	Monsanto	Informe de renovación	2007
Bt11	<i>cry1ab</i>	Lepidóptera	Syngenta	Informe	1996 ^b
1507	<i>cry1f</i>	Lepidóptera	Pioneer	Informe	2001
59122	<i>cry34ab1</i> , <i>cry35ab1</i>	Coleóptera	Pioneer/ Myogen Seeds	Solicitado	2005
1507 x 59122	<i>cry1f</i> , <i>cry34ab1</i> , <i>cry35ab1</i>	Lepidóptera, Coleóptera	Dow Agrosiences	Solicitado	2005
1507 x NK603	<i>cry1f</i>	Lepidóptera	Pioneer/ Myogen Seeds	Solicitado	2005
NK603 x MON810	<i>cry1ab</i>	Lepidóptera	Monsanto	Solicitado	2005
59122 x 1507 x NK603	<i>cry1f</i> , <i>cry34ab1</i> , <i>cry35ab1</i>	Lepidóptera, Coleóptera	Pioneer	Solicitado	2006
MON88017	<i>cry3bb1</i>	Coleóptera	Monsanto	Solicitado	2008
MON89034 x MON88017	<i>cry1a.105</i> , <i>cry2ab2</i> , <i>cry3bb1</i>	Lepidóptera, Coleóptera	Monsanto	Solicitado	2009
MON89034 x NK603	<i>cry1a.105</i> , <i>cry2ab2</i>	Lepidóptera	Monsanto	Solicitado	2009
MIR604	<i>mcry3a</i>	Coleóptera	Syngenta	Solicitado	2010
Bt11 x MIR604 x GA21	<i>cry1ab</i> , <i>mcry3a</i>	Lepidóptera, Coleóptera	Syngenta	Solicitado	2010

^a *Solicitado*: solicitud presentada, de momento bajo evaluación de las autoridades nacionales competentes y/o de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA); *Informe*: evaluación de riesgos completada por las autoridades nacionales competentes y por el EFSA, informe científico a disposición (<http://gmo-compass.org/eng/home>), en espera de la decisión de la Comisión Europea; *Renovación*: producto existente, renovación de la autorización en progreso.

^b Solicitud ampliada en 2003.



OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tuvo como objetivo el estudio del efecto de las proteínas Cry1Ab y Cry1F de *B. thuringiensis* sobre el lepidóptero *O. nubilalis*, para contribuir a la comprensión del mecanismo por el cual esta plaga puede desarrollar resistencia a estas toxinas insecticidas, actualmente expresadas en el maíz transgénico. Ese objetivo principal se abordó mediante la realización de los siguientes objetivos más parciales:

1. Caracterización del potencial de resistencia

- 1.1. Caracterización de la susceptibilidad a varias proteínas de las familias Cry1 y Cry2 de una población autóctona de campo procedente de cultivos tratados con formulados Bt y ensayos de selección en el laboratorio con la proteína Cry1Ab;
- 1.2. Análisis genético cuantitativo de la tolerancia a la proteína Cry1Ab en isolíneas derivadas de campo;

2. Análisis de la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F al epitelio intestinal

3. Caracterización de los genes que codifican para los receptores de las proteínas Cry1

- 3.1. Análisis de la segregación del gen codificante para la caderina en familias tolerantes a Cry1Ab;
- 3.2. Secuenciación y caracterización los transcritos codificantes para aminopeptidasas (APN) expresados en el intestino;
- 3.3. Caracterización funcional de diferentes isoformas de APN e identificación de las isoformas que interaccionan con las proteínas Cry1Ab y Cry1F.



MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 COLONIAS DE *O. nubilalis*

3.1.1 Origen

La colonia PH se estableció en nuestro laboratorio a partir de larvas capturadas en el septiembre 2007 en invernaderos de la zona de Pilar de la Horadada, en la provincia de Alicante. En estos invernaderos, la plantación principal eran pimientos dulces, *Capsicum annuum*, que se cultivaban desde marzo hasta mediados de octubre. Para controlar la plaga primaria de lepidópteros presente en esta área (*S. exigua*) cada dos semanas se repetían tratamientos con productos insecticidas basados en Bt. Estos tratamientos se realizaban utilizando alternativamente productos preparados con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (principalmente Delfin de Syngenta) o var. *aizawai* (principalmente Xentari GD de Kenogard). El éxito obtenido en el control de *S. exigua* favoreció un aumento del número de individuos del taladro del maíz, normalmente una plaga secundaria en los invernaderos de hortícolas, que en este caso se convirtió en la plaga primaria. Los mismos productos Bt utilizados para controlar la infestación de *S. exigua* se siguieron utilizando para controlar la presencia de *O. nubilalis*, sin obtener ningún efecto significativo.

Para el establecimiento de la colonia de laboratorio, en septiembre 2007 se recogieron alrededor de 250 pimientos con daños visibles producidos por larvas de *O. nubilalis* (figura 16A) en los invernaderos descritos en el párrafos anterior, de la zona de Pilar de la Horadada. En total, el muestreo cubrió un área aproximada de 1500 m². Los pimientos fueron transportados a nuestro laboratorio donde fueron diseccionados para comprobar la presencia de larvas (figura 16B). En cada fruto encontramos de una a tres larvas (normalmente dos), entre el tercer y el quinto estadio larvario. En muchos frutos, no obstante los daños visibles, no encontramos larvas. Las larvas recogidas se mantuvieron en una cámara de cuarentena (25 ± 0,3°C, 70 ± 5% humedad relativa, 16/8 h fotoperiodo luz/oscuridad) hasta la pupación. Durante dos semanas, cada dos días se recogieron los individuos que habían alcanzado el estadio de pupa. Éstas se sumergían durante 2 min en una solución de lejía al 1% para minimizar la contaminación producida por patógenos presentes en el campo y, seguidamente, se almacenaban a 19°C para ralentizar el desarrollo y sincronizar el ciclo de los individuos recogidos. En la muestra final obtuvimos 104 pupas que fueron confinadas en una jaula cilíndrica (20 cm diámetro x 35 cm altura) para la eclosión y el apareamiento de los adultos. Durante dos semanas, se recogieron cada dos días los huevos depositados y se trasladaron a la cámara de cría de lepidópteros para formar la generación F₁, la primera totalmente

desarrollada en laboratorio. A partir de una muestra poblacional de la generación F₂ de esta colonia, se derivó la colonia PH-Sel, sometida a un proceso de selección con la proteína Cry1Ab.



Figura 16. Capturas de larvas de *O. nubilalis* en un cultivo de pimiento en invernadero. A) Daño sobre pimiento causado por la penetración de las larvas en el interior del fruto; B) Larva del taladro del maíz alimentándose en el interior de un fruto de pimiento.

La colonia LAB, que se utilizó como colonia de referencia, proviene de una colonia de laboratorio mantenida en el INRA de Montpellier (Francia). Para los ensayos de silenciamiento génico (realizados durante la estancia en EEUU) se compararon huevos de *O. nubilalis* a los laboratorios Benzon Research (Carlisle, PA, EEUU) o Lee French (Lumberton, MN, EEUU) y a partir de ellos se obtuvieron las larvas utilizadas en los ensayos.

3.1.2 Mantenimiento

Las colonias de *O. nubilalis* fueron mantenidas en cámaras de cría de insectos acondicionadas con una temperatura constante de $25 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa de $70 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad), con tubos fluorescentes que cubrían el rango de longitud de onda de la luz visible. En estas condiciones de cría, el ciclo biológico de *O. nubilalis* se completa en unos 30-35 días (Figura 17). Las larvas se mantuvieron en cajas de cría de insecto hasta el estadio de pupa, alimentándose sobre una dieta artificial (Anexo 1). Cuando las larvas alcanzaban el último estadio, se ponían unos trozos de cartón doblados en acordeón para proporcionar a las larvas el sitio ideal para pupar. Cada 2 o 3 días, se recogían los individuos que habían alcanzado el estadio de pupa y se ponían en jaulas cilíndricas de 20 cm de diámetro y 35 cm de altura, sobre las cuales se colocaba una hoja de papel blanco para la puesta de los huevos, bajo unas bayetas constantemente mojadas, para proporcionar la humedad adecuada. La base de la jaula consistía en una bandeja rellena con tierra para gatos, anegada de agua. Los

adultos se alimentaban con una solución de miel en agua al 10% (v/v). Los huevos recogidos se pasaban a las cajas de cría con comida para completar el ciclo.

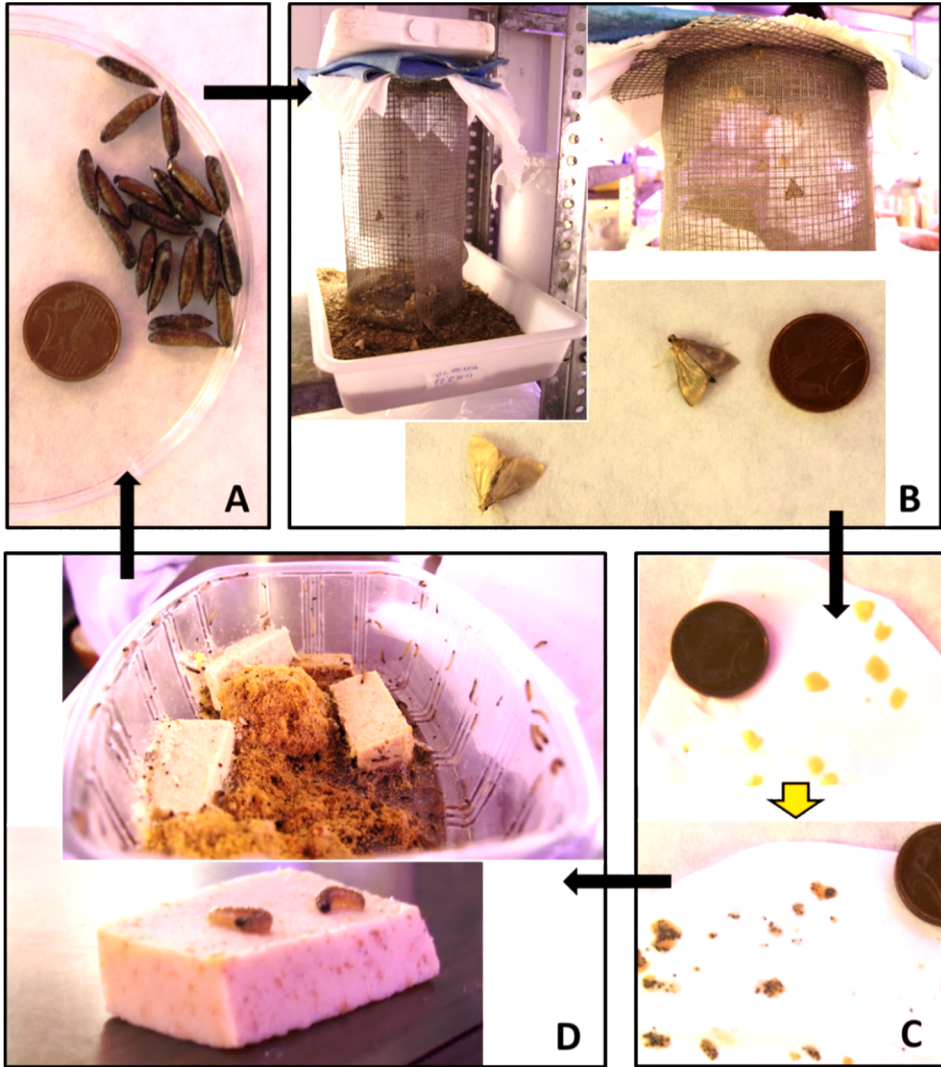


Figura 17. Ciclo biológico de *O. nubilalis* en condiciones de laboratorio. A) Pupas, B) jaulas para el mantenimiento de los adultos, C) huevos depositados sobre papel (foto de arriba: huevos recién depositados; abajo: larvas a punto de emerger de los huevos), D) caja de cría de larvas, con comida artificial.

3.2 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Cry

3.2.1 Obtención de las proteínas Cry a partir de cepas de *B. thuringiensis*

Las proteínas Cry1Aa y Cry2Aa se obtuvieron de cepas transgénicas de *B. thuringiensis* cedidas por la compañía Monsanto (Chesterfield, Mo, EEUU). La cepa EG1273, productora de la proteína Cry1Aa, era resistente a tetraciclina y la cepa EG7543, productora de la proteína Cry2Aa, resistente a cloranfenicol.

Las cepas de *B. thuringiensis* se crecieron en medio CCY (Anexo 2) suplementado con sales minerales (Anexo 2) para facilitar la esporulación del cultivo y con el antibiótico correspondiente (10 µg/ml de tetraciclina o 3 µg/ml de cloranfenicol). El método de cultivo empleado, descrito previamente por Stewart *et al.* (1981), consta de tres fases: crecimiento en placa, precultivo líquido y cultivo líquido final. En primer lugar, se crecieron las cepas de *B. thuringiensis* en placas de medio CCY (48 h a 29°C). Se seleccionó una colonia aislada y se utilizó para inocular un pequeño precultivo en medio líquido (10 ml), que se creció a 29°C en agitación constante durante 48 h. Transcurrido ese tiempo se comprobó por microscopía de contraste de fases que al menos el 90% del cultivo habían esporulado y producido cristales paraesporales. Entonces, el precultivo se incubó se a 70°C durante 30 min para sincronizarlo (por eliminación de las células vegetativas). El cultivo final se inoculó empleando el precultivo sincronizado (0,5 ml por litro de medio CCY final) y se incubó con agitación constante a una temperatura de 29°C durante 48 – 72 h, transcurridas las cuales se realizó un seguimiento del proceso comprobando por microscopía de contraste de fases la esporulación de al menos el 90% de las células. El cultivo esporulado se centrifugó a 4°C a 15000 x *g* durante 12 min, para sedimentar las esporas y los cristales producidos.

La biomasa obtenida se resuspendió en la solución A (NaCl 1M, EDTA 10 mM), para luego ser centrifugada a 15000 x *g* a 4°C durante 12 min. Ese proceso se repitió 2 veces con la solución A y dos veces con la solución B (KCl 100 mM). Tras los lavados, el sedimento fue resuspendido en el tampón C (Na₂CO₃ 50 mM pH 10,5 para la proteína Cry1Aa y Na₂CO₃ 50 mM pH 12, NaCl 0,1 M para la proteína Cry2Aa), al cual se le añadió DTT 10 mM inmediatamente antes del uso. El sedimento resuspendido se dejó incubando en agitación suave a TA durante al menos 2 h para la solubilización de los cristales paraesporales. Tras la solubilización, se separó el pellet con una centrifugación a 23700 x *g* durante 12

min a 4°C. Las proteínas contenidas en el sobrenadante se cuantificaron por el método Bradford (Bradford, 1976) y se activaron con tripsina (Sigma, Steinheim, Alemania), a razón de 1 mg de tripsina cada 10 mg de proteína. La solución se incubó en agitación suave a 37°C durante 2 horas, luego se centrifugó a 4°C a 23700 x *g* durante 12 min y se recogió el sobrenadante. El estado de las proteínas activadas, así como el de las protoxinas, se analizó con SDS-PAGE (Figura 18). La concentración de las proteínas se midió por densitometría empleando la proteína BSA como estándar (Sigma) y el programa de fotodocumentación 1-D Manager ver. 2.0 (Madrid, España). Las proteínas fueron guardadas a -20°C hasta su posterior uso.

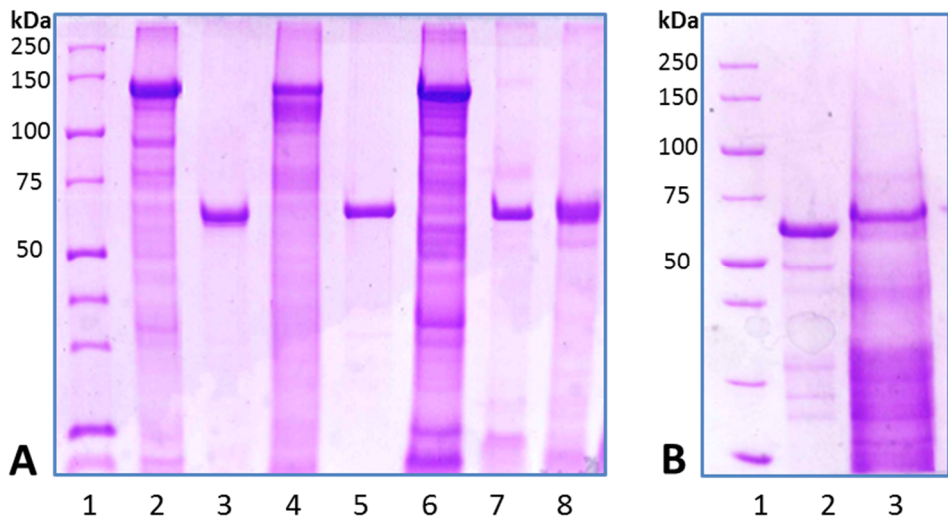


Figura 18. SDS-PAGE (12%) de las proteínas Cry. Panel A: proteínas clase Cry1; carrera 1) marcador de peso molecular, 2) protoxina Cry1Aa, 3) toxina activada Cry1Aa, 4) protoxina Cry1Ab, 5) toxina activada Cry1Ab, 6) protoxina Cry1Ac, 7) toxina activada Cry1Ac, 8) toxina activada Cry1F. Panel B: proteínas clase Cry2; carrera 1) marcador de peso molecular, 2) toxina Cry2Aa activada, 3) protoxina Cry2Aa.

3.2.2 Obtención de las proteínas Cry a partir de *E. coli*

Para la obtención de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F se utilizaron cepas transgénicas de *E. coli*. La información de las cepas utilizadas se describe en la Tabla 3. Todas las cepas se crecieron en medio suplementado con ampicilina (100 µg/ml). El esquema general de crecimiento está compuesto de las siguientes fases: crecimiento en placa, precultivo líquido y cultivo líquido final. El medio TB que se utilizó en las fases de crecimiento en placa y precultivo líquido se suplementó con 2% (p/v) de glucosa. El crecimiento en placas Petri se realizó durante 12 h a 37°C. El precultivo (en medio líquido) se realizó empleando un

volumen pequeño (10 ml) de medio y utilizando como inóculo una colonia aislada que había crecido anteriormente en la placa. Se incubó 8 h a 37°C en agitación suave. El cultivo final (500 ml) se inoculó con 5 ml de precultivo líquido y se creció 60 - 72 h a 28°C en agitación suave. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a una velocidad de 7000 x g a 4°C durante 15 min, para sedimentar la biomasa obtenida.

Tabla 3. Descripción de las cepas recombinantes de *E. coli* utilizadas

Proteína Cry expresada	Código cepa	Plásmido	Cedida por	Medio cultivo ^b
Cry1Aa	ECE52	pOS4101	BGSC ^a	Luria-Bertani (LB)
Cry1Ab	GG194-208	pDB140	R. de Maagd	Terrific broth (TB)
Cry1Ac	ECE53	pOS4201	BGSC ^a	Luria-Bertani (LB)
Cry1Fa	-	pMH21	R.de Maagd	Terrific Broth (TB)

^a*Bacillus* Genetic Stock Center

^b Descritos en el Anexo 2

Las proteínas Cry, producidas por *E. coli* como cuerpos de inclusión insolubles, se purificaron de forma diferente a las de Bt y de distinta forma dependiendo de su procedencia. Los pasos de purificación iniciales consistieron en un proceso de lisis celular, seguido por una serie de lavados. La purificación de las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac se llevó a cabo utilizando el método descrito por Lee *et al.* (1992) que, brevemente, consiste en resuspender el pellet obtenido de la fermentación en el tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 50 mM, sacarosa 15% (p/v), con lisozima (2 mg/ml) para facilitar la ruptura de la pared bacteriana y dejarlo en agitación constante a 4°C durante toda la noche, transcurrida la cual la lisis total de las células bacterianas se consigue con una sonicación a 60% de potencia durante 5 min (repetido 3 veces). De esta forma, los cuerpos de inclusión liberados al medio se pueden recoger con una centrifugación de 15 min a 15000 x g a 4°C. Seguidamente, el sedimento se resuspende en la solución NaCl 0,5 M, Triton X-100 2% (v/v) (2 veces), luego se lava con una solución NaCl 0,5 M (5 veces) y finalmente con agua destilada (2 veces).

La purificación de las proteínas Cry1Ab o Cry1Fa se realizó siguiendo el método descrito por Herrero *et al.* (2004). La biomasa recogida tras la primera centrifugación se congeló a -20°C durante por lo menos 20 min. El pellet congelado se resuspendió vigorosamente en el tampón de lisis (Tris-HCl, pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM), al cual se le añadieron 800 µg de lisozima por gramo de biomasa obtenida y se incubó a TA durante 20 min en agitación constante. A continuación, se añadieron 4 mg de ácido deoxicólico por gramo de *E. coli* y se incubó en agitación a 37°C durante 10 min. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 30 min

en agitación con 200 µg de DNasa por gramo de biomasa, para romper los filamentos de ADN que quedaban en el medio tras la ruptura de las células. Finalmente se centrifugó a 23700 x *g* a 4°C durante 10 min. El sedimento, que contenía los cuerpos de inclusión, se lavó 2 veces con tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 1M, Triton X-100 1% v/v) y dos veces con tampón PBS (KH₂PO₄ 1mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM pH 7,4).

Los procesos de solubilización de la protoxina a partir de los cuerpos de inclusión y la activación con tripsina se realizaron de la misma forma para todas las cepas: el sedimento lavado se resuspendió en el tampón de solubilización (Na₂CO₃ 50 mM, pH 10,5, NaCl 100 mM, DTT 10 mM) y se incubó en agitación constante a TA durante 2 h. Después se siguió el mismo protocolo descrito en el párrafo 3.2.1 para la solubilización de las proteínas Cry1Aa y Cry2Aa y el estado de las proteínas activadas así como de las protoxinas se analizó con SDS-PAGE (Figura 18).

3.2.3 Purificación cromatográfica de las proteínas Cry

La purificación de las proteínas Cry por cromatografía de intercambio iónico, es necesaria si se desea emplear las toxinas en técnicas como los ensayos de unión a BBMV *in vitro*, inmunodetección o en ensayos de citotoxicidad. La purificación se realizó con un equipo Äkta Explorer (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Las proteínas Cry fueron dializadas O/N a 4 °C en tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,6), centrifugadas a 12000 x *g* y filtradas con filtros de acetato de celulosa con porosidad de 20 µm, antes de ser cargadas en la columna HiTrap Q HP de 5 ml (capacidad dinámica 70 mg BSA/ml medio) (GE Healthcare). El tampón B (Tris-HCl 20 mM, pH 8,6, NaCl 1M) se utilizó para crear un gradiente iónico lineal (hasta 60 % de concentración del tampón B) que permitiera la elución de las moléculas retenidas en la columna (Figura 19). Se recogieron alícuotas de 250 µl y se comprobó la presencia de la proteína purificada en las alícuotas con SDS-PAGE 12%. La toxina purificada se cuantificó por el método de Bradford.

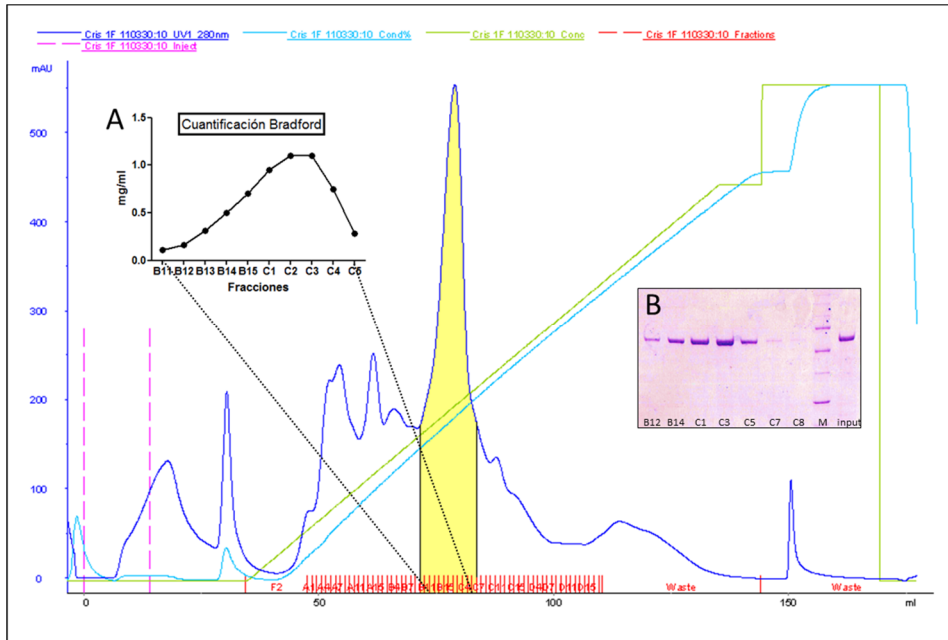


Figura 19. Purificación de la proteína Cry1F por cromatografía de intercambio iónico. Cromatograma de la purificación: en amarillo se resalta el pico correspondiente a la proteína Cry1F. A) Cuantificación Bradford de las fracciones que componen el pico de la proteína Cry1F; B) SDS-PAGE 12% de parte de las fracciones que componen el pico de la proteína Cry1F (M marcador de peso molecular).

3.3 ENSAYOS DE MORTALIDAD

3.3.1 Ensayos con toxinas purificadas

Los ensayos de mortalidad se realizaron empleando larvas neonatas (12 ± 3 h) en ayunas. Se empleó la técnica de contaminación en superficie (Ferré *et al.*, 1991), utilizando bandejas de bioensayo de 128 pocillos de 2 cm² de superficie. Los pocillos se rellenaban con dieta artificial que se dejaba solidificar. Antes del uso las bandejas se exponían a rayos UV durante 10 min, al fin de esterilizar la superficie de la dieta de cualquier posible contaminación ambiental. Seguidamente en cada pocillo se dispensaban 50 μ l de la toxina que se iba a ensayar diluida en tampón carbonato 50 mM (pH 10,5, excepto el caso de Cry2Aa por la cual se utilizaba pH 12) ó de tampón correspondiente sin toxina (control), y se dejaba secar en la campana de flujo laminar. Para cada ensayo se probaron como mínimo 7 concentraciones más el control negativo con tampón carbonato (16 larvas cada concentración). Los valores de mortalidad descritos en literatura para poblaciones de *O. nubilalis* susceptibles (www.glfrc.forestry.ca/bacillus/) se utilizaron para determinar el rango de concentraciones adecuadas para cada ensayo, ya que al

menos 5 de las concentraciones empleadas tenían que situarse dentro un rango de mortalidad entre el 10 y el 90%. Los valores de mortalidad fueron recogidos trascurridos 7 días contados a partir del inicio de la exposición a la toxina. Durante este tiempo, las bandejas de bioensayo se mantuvieron a $25 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, boca abajo, con fotoperiodo de 16/18 h (luz/oscuridad) y una humedad relativa del $70 \pm 5\%$. Se consideraron muertas las larvas que no tenían reacción al ser estimuladas por un pincel. Cada bioensayo se repitió de 2 a 4 veces. En el caso de la colonia PH se utilizaron larvas procedentes de las generaciones F_2 y siguientes.

Los valores de concentración que producían un 50% de mortalidad en la población analizada por cada ensayo (CL_{50}) fueron estimados a partir de los valores de mortalidad empleando el análisis Probit (Finney, 1971) mediante el programa POLO-PC (LeOra Software, Berkeley, CA, EEUU). El análisis de la potencia relativa (realizado por el programa POLO-PC) fue utilizado para comparar la susceptibilidad de la población PH y de la población control LAB. Este tipo de análisis es admitido solo cuando las curvas de mortalidad de las dos poblaciones a comparar son paralelas.

3.3.2 Ensayos con el producto estándar HD-1-S-2005

Los ensayos con el producto estándar HD-1-S-2005 (Valent Biosciences, Libertyville, IL, EEUU), producido a partir de la cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Las concentraciones de producto estándar HD-1-S-2005 ($6,1 \times 10^4$ IU/mg) que se emplearon se eligieron a partir de los valores de mortalidad producidos por el producto comercial Dipel ES (basado en *B. thuringiensis* var. *kurstaki*) descritos en literatura para *O. nubilalis* (Li *et al.*, 2005). Se emplearon 7 concentraciones de producto estándar HD-1-S-2005 resuspendido en agua destilada, más el control negativo correspondiente a sólo agua destilada.

3.3.3 Ensayos de mortalidad funcional

El procedimiento empleado fue similar al descrito anteriormente para los ensayos de mortalidad (apartado 3.3.1), con la diferencia que se consideraron como muertas las larvas que no habían pasado del primer estadio (Marçón *et al.*, 1999). Durante los ensayos de mortalidad se obtuvieron unos valores preliminares que sirvieron para ajustar las concentraciones utilizadas para realizar estos ensayos. Los valores de concentración que provocaron un 50% de mortalidad funcional (CF_{50})

fueron estimados empleando el análisis Probit, de la misma forma que para los ensayos de mortalidad.

3.3.4 Ensayo de selección

Los ensayos de selección con la proteína activada Cry1Ab se realizaron a partir de una muestra poblacional de la generación F₂ de la colonia PH. La toxina Cry1Ab se administraba a las larvas recién nacidas mediante el método de incorporación en la dieta debido al carácter taladrador de estos insectos (Huang *et al.*, 1997). Para ello, una vez añadido el agar al resto de ingredientes de la dieta, se dejaba enfriar el compuesto hasta una temperatura menor de 40°C y se le añadía la cantidad de toxina necesaria para obtener la concentración adecuada. Los huevos se ponían en cajas de cría junto a la dieta suplementada y las larvas se alimentaban solamente con dieta suplementada con toxina Cry1Ab, que se cambiaba regularmente cada dos o tres días durante un mes. Las larvas supervivientes se traspasaban a dieta sin intoxicar para pupar. Este tipo de ensayo pretendía imitar la fuerte presión de selección que el maíz transgénico ejerce en el campo. Trascurrido un mes en dieta sin intoxicar, aquellas larvas que aún no habían conseguido pupar se descartaban.

Se realizaron dos ensayos con diferentes concentraciones de toxina, que se eligieron en base a los valores de mortalidad obtenidos en bioensayos realizados con el método de incorporación en dieta y descritos en la literatura (www.glfcc.forestry.ca/bacillus/). En el ensayo denominado 10x se utilizó una concentración inicial de toxina muy alta (2 µg/ml) mientras que en el ensayo denominado 1x la concentración de la proteína Cry1Ab inicial fue de 0,2 µg/ml y se fue incrementando durante el proceso de selección hasta llegar a 2 µg/ml. Este segundo ensayo constó de tres fases: una primera fase (F₀-F₂) en la cual se empleó la toxina a la concentración de 0,2 µg/ml, una segunda fase (F₃-F₆) en la cual la concentración de proteína Cry1Ab se aumentó a 1 µg/ml y una última fase (F₇-F₁₂) en la que se utilizó una concentración de 2 µg/ml, diez veces mayor que la concentración inicial. Para cada ensayo se utilizaron inicialmente unos 5000 huevos. Todos los huevos que se recolectaron tras cada generación de selección se criaron en dieta suplementada.

Los niveles de resistencia desarrollados se midieron con ensayos de mortalidad utilizando larvas de la selección 1x pertenecientes a las generaciones 3, 5, 9 y 10. Los ratios de resistencia (RR) se obtuvieron dividiendo los valores de CL₅₀ de la cepa seleccionada por los de la colonia PH sin seleccionar. Estos

bioensayos son solamente indicativos del progreso de la selección, ya que en unos casos se realizó una sola repetición con siete concentraciones de toxina, para no disminuir el número de insectos sujetos a selección.

3.4 ANÁLISIS GENÉTICO CUANTITATIVO DE LA TOLERANCIA A LA PROTEÍNA Cry1Ab

La utilización del término tolerancia en este ensayo se refiere a una medida cuantitativa de la resistencia que tiene una distribución normal entre los individuos de una población (Finney, 1971; Firko y Hayes, 1990). Utilizamos técnicas de genética cuantitativa para estudiar el rasgo de la tolerancia en poblaciones de campo españoles (procedentes de áreas con presencia de cultivos de maíz como la valle del Ebro y de la provincia de Badajoz), en colaboración con investigadores del centro de Investigaciones Biológicas CSIC de Madrid.

La estimación de la heredabilidad en sentido estricto (h^2) de la tolerancia a la proteína Cry1Ab en *O. nubilalis* se estudió utilizando los valores de mortalidad obtenidos en isolíneas de hermanos completos establecidas en el centro de Investigaciones Biológicas CSIC de Madrid por la doctora Gema Farinós y sujetas a cribado con una dosis de proteína Cry1Ab que teóricamente provoca una mortalidad del 90% (Figura 20). La estimación de la heredabilidad se determinó considerando la mortalidad registrada después de la exposición a la proteína Cry1Ab como un rasgo umbral del cual la tolerancia es la variable continua subyacente (Falconer and Mackay, 1996). Dos diferentes métodos fueron empleados: el primero basado en la varianza en mortalidad entre isolíneas obtenida en la generación F₁ (Tabashnik y Cushing, 1989; Bull *et al.*, 1982); el segundo basado en la respuesta a selección en la generación F₂ (Firko and Hayes, 1990).

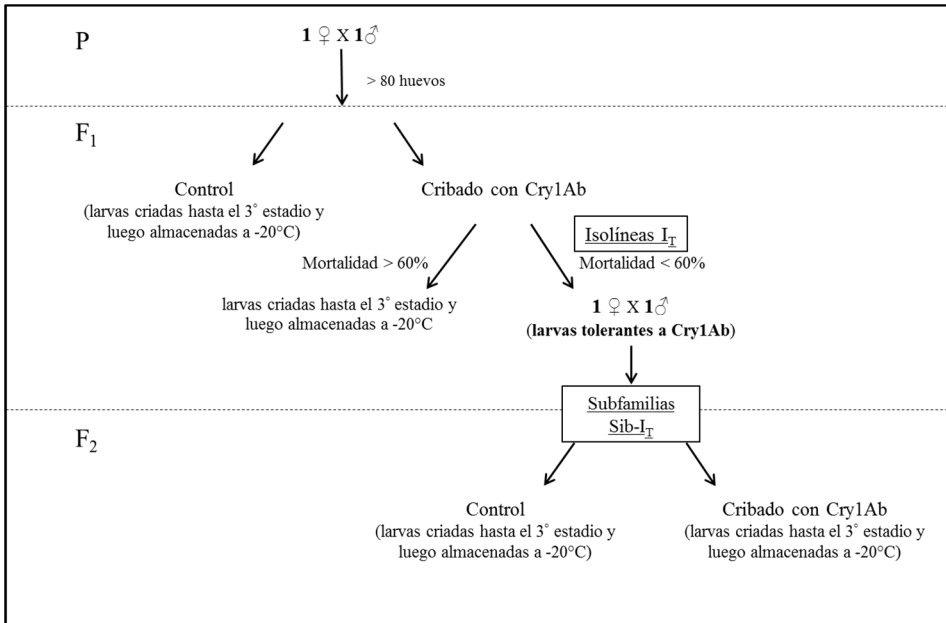


Figura 20. Esquema de los cruces realizados para obtener familias de *O. nubilalis* tolerantes a Cry1Ab. P) Cruce entre dos adultos procedentes de dos diferentes localidades (B x E y cruce recíproco E x B); F₁) Los descendientes de cada isolínea se dividen en dos grupos: control y tratados. Las larvas tratadas son sujetas a cribado con una dosis de proteína Cry1Ab capaz de matar teóricamente al 90% de las larvas susceptibles. Las isolíneas con mortalidad menor de 60% (denominadas isolíneas I_T) fueron elegidas para obtener la generación siguiente mediante cruces individuales dentro de cada isolínea; F₂) Cribado de las subfamilias Sib-I_T utilizando la misma dosis de toxina Cry1Ab empleada con la generación precedente. Los individuos congelados se utilizaron para la purificación de ADN y el análisis EPIC-PCR, utilizada para el estudio de la segregación de los alelos de la caderina.

El primer método, llamado método de contingencia, fue descrito por Bull y colaboradores en 1982 y adaptado más tarde por Tabashnik y Cushing (1989) para estimar la heredabilidad de la resistencia a insecticidas. En este método la varianza de un rasgo umbral, σ_g^2 (como mortalidad o supervivencia) entre familias se puede estimar de la manera siguiente:

$$\sigma_g^2 = \left[\frac{S}{(f-1)} \times \frac{n}{(n-1)} \right] - \frac{p(1-p)}{(n-1)}$$

Donde S es la suma de los cuadrados entre familias, f es el número de familias, n el número de individuos por familia y p la proporción media de población que expresa el rasgo (en nuestro caso, supervivencia media):

$$p = \frac{1}{f} \sum_i p_i$$

$$S = \sum_i (p_i - p)^2$$

Bull y colaboradores (1982) demostraron que la variable Booleana de correlación entre parientes (ρ_β) del rasgo umbral (supervivencia) se podía calcular de la siguiente manera:

$$\rho_\beta = \frac{\sigma_g^2}{p(1-p)}$$

Y por la cual, si $p = 0,5$ la correlación de la variable continua subyacente (tolerancia) se estimaría como:

$$\rho_x = \sin\left(\frac{\pi}{2 \times \rho_\beta}\right)$$

Finalmente, la heredabilidad de la tolerancia se obtiene con la formula $2\rho_x$ para familias de hermanos completos. En nuestro caso, la proporción media p de población que expresaba el rasgo (sobrevivencia media) era diferente de 0,5 por lo cual el valor ρ_x se calculó utilizando tablas para el cálculo de probabilidades según una distribución normal bivalente (Owen 1962) y aplicando la formula descrita por Bull y colaboradores (1982). La utilización de un esquema experimental que utiliza familias de hermanos completos conlleva que la variación entre familias sea a menudo aumentada por el ambiente común y por la varianza debida a la dominancia, por lo cual la estimación de la heredabilidad obtenida con este método representa solamente el límite mayor (Falconer y Mackay, 1996).

En el segundo método, la heredabilidad se estimó comparando la proporción de individuos tolerantes en la población (en este caso larvas supervivientes al cribado con la proteína Cry1Ab y pertenecientes a isolíneas con mortalidad menor del 60%) con la proporción de individuos tolerantes en la generación siguiente, tras un paso de selección con la proteína Cry1Ab (Figura 20). La heredabilidad realizada se estimó con la siguiente ecuación:

$$h^2 = 2\mu' / \mu_s$$

Donde μ_s representa la media de los valores de la variable subyacente (tolerancia) en los individuos tolerantes que se cruzaron para obtener la generación siguiente, y μ' la media de los valores de tolerancia en la generación siguiente. Ambos parámetros fueron derivados de las formulas descritas por Hartl y Clark (1989) a

partir de la proporción de individuos tolerantes obtenidos en cada generación. También en este segundo caso, el ambiente común puede afectar a la estimación de la heredabilidad, por lo que el valor obtenido representa solamente el límite mayor (Falconer y Mackay, 1996).

El número mínimo de factores segregantes independientes (n_E) con efectos iguales y aditivos sobre la tolerancia a la proteína Cry1Ab fue estimado utilizando el método propuesto por Lande en 1981, aplicando la siguiente fórmula:

$$n_E = \frac{[\sum_{i=1}^n \sigma_i^2]^2}{\sum_{i=1}^n (\sigma_i^2)^2}$$

Donde σ^2 es la varianza del rasgo calculada en cada generación y n el número de generaciones seleccionadas. Para obtener la varianza de un rasgo que es una variable subyacente (como la tolerancia), y de la cual tenemos solo la proporción de individuos que expresan el rasgo (p), utilizamos la fórmula:

$$\sigma_x^2 = (1 - p)/i^2 A$$

En la que i es la desviación media de los individuos tolerantes desde la media poblacional (valor tabulado por Falconer y Mackay, 1996) y A el número de individuos tolerantes.

Finalmente, para comparar los valores de mortalidad entre grupos de isolíneas (isolíneas totales e isolíneas I_T) y generaciones utilizamos el test no paramétrico de Mann-Whitney. Este mismo test se utilizó para evidenciar diferencias en la mortalidad en las isolíneas de la generación F₁ dependiendo del origen de los parentales fundadores. El test ANOVA se utilizó para determinar si las frecuencias de mortalidad transformadas a arco-seno y obtenidas en las subfamilias sib-I_T dependían de la isolínea I_T de origen.

3.5 PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA

Las vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV, según su sigla en inglés) del epitelio intestinal de *O. nubilalis* y de *S. frugiperda* se prepararon según el método descrito por Wolfersberger y colaboradores (1987), con pequeñas modificaciones. Para la obtención de los intestinos de *O. nubilalis* se utilizaron larvas a comienzo del quinto estadio de desarrollo, procedentes de la colonia LAB, inmovilizadas en hielo durante 5 min. Las larvas se diseccionaron en tampón MET (manitol 300 mM, EGTA 5 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,5) con PMSF 1 mM, se

extrajeron los intestinos y se eliminó la membrana peritrófica con su contenido. Los epitelios se lavaron en tampón MET y se congelaron a -80°C hasta su uso. En el caso de *S. frugiperda* se utilizaron intestinos almacenados a -80°C , gentilmente cedidos por la Dra. Sara Hernández. Para la preparación de las BBMV, los intestinos congelados se homogeneizaron mecánicamente en hielo en diez volúmenes de tampón MET, utilizando un homogeneizador Potter. En el caso de la preparación de BBMV para ensayos de inmunodetección de la unión de las toxinas Cry, se suplementó el tampón de homogeneización con PMSF 1 mM y un coctel de inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania). Los intestinos homogeneizados se filtraron a través de tres capas de gasa estéril para retener los lípidos y los agregados celulares grandes y luego se añadió un volumen de MgCl_2 24 mM, para promover la precipitación selectiva de las membranas vaso-laterales. La mezcla se mantuvo en hielo durante 15 min y se centrifugó 10 min a 4°C a $2500 \times g$. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a $48000 \times g$ durante 20 min a 4°C para recuperar el sedimento que seguidamente se resuspendió en la mitad de tampón MET utilizado inicialmente y se volvió a homogeneizar. Se le añadió un volumen de MgCl_2 24 mM, se incubó la mezcla en hielo durante 15 min y se centrifugó nuevamente de forma diferencial como se ha descrito anteriormente. El pellet final se resuspendió en tampón MET a la mitad de la concentración inicial. La concentración de proteínas en la suspensión de vesículas se determinó por el método de Bradford. Las BBMV se usaron de forma inmediata para los ensayos de inmunodetección de proteínas o se alicuotaron, congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

3.6 MARCAJE DE LAS PROTEÍNAS Cry CON BIOTINA

El marcaje con biotina se realizó utilizando las proteínas Cry previamente purificadas por Äkta (apartado 3.2.3). La proteína a marcar se dializó O/N a 4°C en tampón carbonato 40 mM (pH 8,6), luego se centrifugó a $12000 \times g$ durante 10 min a 4°C y se incubó en agitación durante 2 horas con el reactivo de biotilación (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) a razón de $400 \mu\text{l}$ de reactivo cada mg de proteína. La proteína biotilada se purificó por cromatografía de exclusión molecular con una columna PD10 (GE Healthcare) para eliminar los residuos de biotina libre que quedaban en la solución. Las fracciones con la toxina marcada se identificaron mediante un ensayo de hibridación en mancha (Dot-blot, según su nombre en inglés). Depositamos una gota de $2 \mu\text{l}$ de cada fracción encima de una membrana de nitrocelulosa Amersham Hybond™ ECL (GE Healthcare) y,

tras un secado de 5 min, las uniones inespecíficas a la membrana se bloquearon con una incubación de 5 min, en agitación, en una solución de Membrane Blocking Reagent 3% (p/v) (GE Healthcare) en tampón PBST (PBS, Tween 20 0,1% (v/v)). El exceso de tampón de bloqueo se eliminó mediante dos lavados de la membrana de 2,5 min, en agitación, con PBST. Seguidamente la membrana se incubó durante 10 min con streptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (Roche) a una concentración de 1:2000 en PBST. Se eliminó el exceso de streptavidina mediante dos lavados de 2 min en PBST y se incubó la membrana en oscuridad en el tampón Genius 3 (Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM) suplementado con el reactivo NBT/BCIP 2% (v/v) (Roche), hasta la aparición de la señal. La concentración de las proteínas Cry biotiniladas se determinó por el método Bradford y las alícuotas se guardaron a 4°C hasta su uso.

3.7 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

3.7.1 Electrotransferencia de proteínas

Tras la separación por SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Amersham Hybond™ ECL en una unidad de transferencia Amersham Biosciences TE70 (GE Healthcare) en sistema semiseco, utilizando un tampón compuesto por glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037% (p/v) y metanol 20% (v/v). La electrotransferencia se realizó durante 1 h a intensidad constante de 0,9 mA/cm², transcurrida la cual la eficiencia se determinó tras tinción de las proteínas retenidas en las membranas con una solución de rojo Ponceau (Sambrook y Russell, 2001). Previamente a la exposición a las proteínas Cry o a los anticuerpos, se bloquearon las uniones inespecíficas de la membrana incubándola en una solución de Membrane Blocking Reagent 3% (p/v) en tampón PBST O/N, a 4°C. El exceso de tampón de bloqueo se eliminó mediante tres enjuagues de la membrana seguidos de un lavado de 15 min en agitación con PBST.

3.7.2 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana de nitrocelulosa

3.7.2.1 Inmunodetección de proteínas marcadas con biotina

La membrana de nitrocelulosa a la cual se habían transferido las proteínas Cry biotiniladas se incubó con streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (GE Healthcare) a una concentración de 1:2000 en PBST, durante 1 h en agitación constante. Seguidamente se eliminó el exceso de streptavidina mediante tres

enjuagues seguidos de un lavado de 15 min en agitación con PBST, y se añadió el sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano (Sigma). La quimioluminiscencia producida por la reacción se captó con el detector ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

3.7.2.2 *Inmunodetección de proteínas con cola de histidina*

La membrana de nitrocelulosa que contenía las proteínas con cola de histidina inmovilizadas, se incubó durante 1 h con el anticuerpo monoclonal anti-his tag generado en ratón (Clontech, Mountain View, CA, EEUU) (1:5000 en PBST). Seguidamente se eliminó el anticuerpo no unido mediante tres enjuagues de la membrana, seguidos de un lavado de 15 min en agitación con tampón PBST. Tras los lavados, la membrana se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conjugado con la fosfatasa alcalina (Sigma) (1:2000 en PBST). Se repitieron los lavados anteriormente indicados, más un lavado de un minuto con el tampón Genius 3. Para la detección de la señal, se incubó la membrana en el reactivo NBT/BCIP 2% (v/v) en tampón Genius 3, en oscuridad, hasta la aparición de las bandas.

3.7.2.3 *Inmunodetección de la caderina*

La membrana de nitrocelulosa a la cual se habían transferido las proteínas de las BBMV frescas de *O. nubilalis*, previamente separadas por SDS-PAGE 10% (100 µg/pocillo), se incubó durante 1 h con el anticuerpo policlonal anti-caderina de *O. nubilalis* generado en conejo (1:1000 en PBST) que nos fue gentilmente proporcionado por el Dr. Blair Siegfried (University of Nebraska, Lincoln). El exceso de anticuerpo no unido se eliminó mediante los lavados descritos en los apartados anteriores. A continuación, la membrana se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado con la fosfatasa alcalina (Sigma) (1:2000 en PBST). Se repitieron los lavados, más un lavado de un minuto con el tampón Genius 3. La señal se detectó con el reactivo NBT/BCIP, como se ha descrito en el apartado anterior.

3.7.2.4 *Inmunodetección de las proteínas Cry1Ab y Cry1F*

Las membranas de nitrocelulosa que contenían las proteínas Cry1Ab o Cry1F inmovilizadas se incubaron durante 1 h con un anticuerpo monoclonal anti Cry1Ab o anti Cry1F (1:5000 en PBST), ambos producidos en ratón (Abraxis, Warminster, PA, EEUU). Seguidamente se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavados de la membrana como los anteriormente descritos y se volvieron a incubar las membranas durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón,

conjugado con la peroxidasa de rábano (1:5000 en PBST para la detección de Cry1Ab; 1:10000 para Cry1F). Se repitieron los lavados y se añadió el reactivo quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano. La quimioluminiscencia producida por la reacción se detectó con el aparato ImageQuant LAS4000.

3.7.2.5 Inmunodetección de la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F

Las membranas de nitrocelulosa a las cuales se habían transferido 100 µg de proteínas totales de BBMV frescas de *O. nubilalis*, previamente separadas por SDS-PAGE 10%, se incubaron durante 2,5 h en una solución con la proteína Cry1Ab o con la proteína Cry1F, ambas a una concentración de 5 µg/ml en tampón PBS. Seguidamente se llevaron a cabo los lavados de la membrana y las inmunodetecciones de las proteína Cry1Ab o Cry1F se realizaron tal y como se describe en el apartado 3.7.2.4.

3.8 ENSAYO DE UNIÓN DE LA PROTEINA Cry1Ab BIOTINILADA A BBMV DE *O. nubilalis*

El ensayo de la unión en solución de la proteína Cry1Ab biotinilada al epitelio intestinal de *O. nubilalis* consistió en incubar las BBMV con una cantidad fija de toxina biotinilada, en presencia de concentraciones crecientes del mismo tipo de toxina sin marcar. Este tipo de ensayo se denomina de competencia homóloga. En la Tabla 4 están listados los componentes utilizados en estos ensayos y sus respectivas cantidades.

Tabla 4: Componentes del ensayo de unión en solución. Se indican las cantidades de cada componente utilizado en un ensayo de competencia homóloga.

Componentes	Control negativo	Control positivo	25x ^a	50x ^a	100x ^a	200x ^a
BBMV	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg
PBS 10x, BSA 1%	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Agua	x	X	X	x	x	X
Cry1Ab biot.	0 µl	0,15 µg	0,15 µg	0,15 µg	0,15 µg	0,15 µg
Cry1Ab sin marcar	0 µl	0 µg	3,7 µg	7,5 µg	15 µg	30 µg
Volumen final	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

^a Cantidad de competidor utilizado respecto a la proteína biotinilada.

Los componentes de cada ensayo se añadieron siempre siguiendo ese orden: agua, tampón, proteína Cry1Ab sin marcar, proteína biotinilada y BBMV. Las mezclas se incubaron 1h a 25°C, luego se centrifugaron 10 min a 20000 x g a

4°C y los sedimentos, que contenían las BBMV, se lavaron con 100 µl de tampón PBS con BSA 0,1% (p/v). Seguidamente, cada pellet se resuspendió en 10 µl de agua y se resolvió por SDS-PAGE al 12%. La presencia de la proteína Cry1Ab marcada se reveló por inmunodetección de la biotina, como se ha descrito en el apartado 3.7.2.1.

3.9 ENSAYOS DE BLOQUEO DE LA UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS Cry1Ab Y Cry1F A BBMV DE *O. nubilalis*

3.9.1 Bloqueo de la unión con proteínas Cry

En el caso de utilizar como bloqueante la misma proteína Cry que luego se iba a emplear marcada con biotina en el ensayo de unión en solución, los ensayos se denominaron de bloqueo homólogo, y de bloqueo heterólogo en el caso de emplear otra proteína Cry diferente de aquella utilizada en el ensayo de unión. En la Tabla 5 están listados los componentes y las cantidades utilizadas para los ensayos de bloqueo homólogo, en el cual se utilizaron cantidades de toxina sin marcar 25, 50 y 100 veces mayores respecto a la toxina biotinilada.

Tabla 5: Componentes del ensayo de bloqueo homólogo. Se indican las cantidades de cada componente por cada incubación en un ensayo de bloqueo homólogo.

Componentes	Control positivo ^a	Control negativo ^b	25x ^c	50x ^c	100x ^c
BBMV	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg
PBS 10x, BSA 1%	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Bloqueante	0 µl	0 µl	3,7 µg	7,5 µg	15 µg
Agua	X	X	X	x	x
Volumen final	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

^aLas BBMV utilizadas en el control positivo se incubaron con tampón durante el bloqueo y con proteína Cry marcada durante el ensayo de unión.

^bLas BBMV utilizadas en el control negativo se incubaron con tampón tanto durante el bloqueo como en el ensayo de unión.

^cCantidad de bloqueante utilizado en la incubación de bloqueo homólogo, con respecto a la proteína marcada usada en el ensayo de unión.

Los ensayos de bloqueo heterólogo se realizaron de la misma forma, excepto que se utilizaron cantidades de bloqueante 100, 200 y 300 veces mayores respecto a la proteína Cry marcada. El orden en el que se añadieron los componentes fue siempre el siguiente: agua, tampón, BBMV y bloqueante, luego las mezclas se incubaron 1 h a 25 °C. Después de la incubación con el competidor, las BBMV se recuperaron tras centrifugación de 10 min a 20000 x *g* a 4°C y se utilizaron para realizar el ensayo de unión. Para ello, se le añadieron 100 µl de

tampón PBS conteniente BSA 0,1% (p/v) y 15 ng/μl de proteína Cry marcada con biotina, excepto en el control negativo al cual se añadieron 100 μl de PBS suplementado solamente con BSA 0,1% (p/v). Los tubos de ensayo se volvieron a incubar 1 h a 25°C y se procedió a centrifugare las muestras, lavarlas, separar sus componentes por SDS-PAGE y inmunodetectar la presencia de proteína Cry biotinilada como descrito en el apartado 3.8.

3.9.2 Bloqueo de la unión con lectinas

Las lectinas son una familia de proteínas que unen específicamente a determinados azúcares y que se utilizaron para comprobar si las proteínas Cry1Ab y Cry1F unen a proteínas de membrana glicosiladas en *O. nubilalis*. Las BBMV se incubaron utilizando las lectinas concanavalina A, aglutinina de soja (SBA) y aglutinina de germen de trigo (WGA) como bloqueantes, a una concentración de 50 μg/ml, en tampón PBS - BSA 0,1% (volumen final 100 μl). Todas las lectinas utilizadas se adquirieron de Sigma. Tras una hora de incubación a 25°C se añadieron 3 μl de toxina biotinilada (50 ng/μl) y se realizó el ensayo de unión tal y como se ha descrito en el apartado 3.8. Se realizaron por lo menos dos repeticiones de cada ensayo.

3.9.3 Bloqueo de la unión con azúcares

Cuatro tipos de azúcares se utilizaron para preincubar las proteínas Cry que se iban a utilizar en los ensayos de unión a las BBMV de *O. nubilalis*. Todos se compraron a Sigma y fueron: N-acetil-galactosamina (GalNAc), N-acetil-glucosamina (GluNAc), D-manosa y ácido siálico. Los ensayos de bloqueo se realizaron incubando 500 ng de toxina biotinilada durante 1 h a 25°C en una solución de azúcar 250 mM (excepto en el caso del ácido siálico, cuya concentración final fue 50 mM) y PBS - BSA 0,1% (volumen final 100 μl). Una vez terminada la incubación de bloqueo, se utilizaron 30 μl de toxina a una concentración de 5 ng/μl para cada ensayo de unión, y se siguieron los pasos descritos en el apartado 3.8. Se realizaron por lo menos dos repeticiones de cada ensayo.

3.9.4 Bloqueo de la unión con anticuerpo anticaderina

El anticuerpo específico contra la caderina de *O. nubilalis* se utilizó para preincubar las BBMV que luego se iban a utilizar en los ensayos de unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F. En cada incubación de bloqueo se utilizó una cantidad

de 6,25 μg de BBMV de *O. nubilalis* y dos concentraciones del anticuerpo anticaderina (1/100 y 1/10). Cada ensayo se llevó a cabo en el tampón PBS - BSA 0,1%, en un volumen final de 100 μl . Las muestras se incubaron 1 h a 25°C, seguidamente se añadieron 2 μl de toxina biotinilada (25 ng/ μl) y se dejaron incubando 40 min más, transcurridos los cuales se procesaron tal y como descrito en el apartado 3.8 y la presencia de las proteínas Cry1F o Cry1Ab biotiniladas unidas a las BBMV se reveló por inmunodetección. Se realizaron dos repeticiones de cada ensayo.

3.10 PREPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.10.1 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se obtuvo a partir de tórax de adultos y de larvas de tercer estadio, todas procedentes de las isolíneas de *O. nubilalis* que habían sido ensayadas y seleccionadas con la toxina activada Cry1Ab (Figura 20). Todas las muestras para la purificación de ADN se encontraban congeladas a -20°C. Para la purificación de ADN de adultos se utilizó el kit Dneasy Tissue (Qiagen Inc., Valencia, CA, EEUU), según las indicaciones del fabricante, mientras que el Kit PrepMan®Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) se empleó para las extracciones individuales de ADN de larvas, utilizando 120 μl de reactivo por larva y siguiendo las instrucciones del productor. La integridad de las muestras fue evaluada visualizando el ADN purificado en geles de agarosa al 1%. La concentración y la pureza del ADN fueron determinadas por espectrofotometría empleando el espectrofotómetro BioPhotomer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) (A_{260} nm/ A_{280} nm).

3.10.2 Extracción de ARN total

El ARN total fue siempre obtenido a partir de larvas, empleando el reactivo TriPure (Roche) y siguiendo el protocolo del fabricante. Para los estudios de expresión de las *OnAPNs* en los diferentes estadios y tejidos larvarios, se utilizaron larvas enteras de la colonia LAB (para análisis de larvas neonatas o de 7 días), o intestinos larvarios (en el caso de larvas de 14 y 21 días). Para la extracción de ARN de los diferentes tejidos larvarios, se utilizaron larvas de 28 días (larvas de quinto y último estadio larvario) que se diseccionaron para aislar el intestino, el cuerpo graso, los túbulos de Malpighio y por último los restos del individuo (carcasa). De la misma forma, en los estudios de silenciamiento génico, el ARN fue

purificado a partir del intestino larvario. La integridad de las muestras fue evaluada visualizando el ARN purificado en geles de agarosa al 1%. La concentración y la pureza del ARN fueron determinadas por espectrofotometría empleando el espectrofotómetro BioPhotometer ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$).

3.11 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

3.11.1 Amplificaciones mediante PCR

La amplificación de fragmentos de ADN para su posterior clonaje se realizó utilizando siempre la polimerasa de alta fidelidad ExTaq (Takara, Shiga, Japón) que tiene actividad exonucleasica 3'-5' de comprobación y eliminación de nucleótidos erróneos. El volumen final de cada reacción fue de 25 μl y contenía: 1 U de ExTaq, el correspondiente tampón 1x, 200 μM de dNTPs, 0,32 μM de cebadores directo e indirecto y $\leq 1 \mu\text{g}$ ADN. Los pasos de la reacción de amplificación empezaban con un paso de desnaturalización a 94°C de 5 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C 30 s, 50-60°C (dependiendo de la T_m de los cebadores utilizados) 30 s y 72°C 90 s, y como último una amplificación final a 72°C durante 7 min.

Las reacciones de PCR de colonia se realizaron en un volumen final de 25 μl , utilizando 0,75 U de ADN polimerasa de Biotools (Madrid, España), el correspondiente tampón 1x, 200 μM de dNTPs, 0,32 μM de cebadores directo e indirecto y agua MilliQ (Merck Millipore, Billerica, MA, EEUU) en la que se había dispersado una fracción de una colonia de *E. coli*. Los parámetros de la reacción de amplificación fueron: 94°C durante 5 min, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 50-60°C (dependiendo de la T_m del cebador utilizado) durante 1 min y 2 min a 72°C, y una fase final a 72°C durante 5 min.

El tamaño de los amplificadas fue visualizado en geles de agarosa 1% utilizando el marcador Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania) como referencia. Los cebadores utilizados se diseñaron con el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y fueron analizados para comprobar la formación de estructuras secundarias o de posibles dímeros con el programa Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx>). Todos los cebadores empleados a lo largo de la tesis están descritos en el Anexo 3.

3.11.2 Polimorfismo de longitud de secuencia de intrones

Esta técnica, también definida como marcadores EPIC-PCR (del inglés Exon Primed Intron Crossing PCR) se basa en la amplificación de intrones, utilizando cebadores de secuencias complementarias a las de las regiones exónicas que flanquean el intrón, y en la detección de polimorfismos de tamaño. Éstos son visualizados separando los productos de PCR en geles de agarosa 1%. Empleamos un marcador EPIC-PCR que contenía un intrón altamente polimórfico (datos nos mostrados) para caracterizar la segregación de los alelos del gen codificante para la caderina relacionado con el modo de acción de las proteínas Cry en lepidópteros (*cdh*, GenBank DQ000165.1), en las familias de *O. nubilalis* tolerantes a Cry1Ab (Figura 20). Previamente se demostró que el gen *cdh* es presente en *O. nubilalis* en copia única (Bel *et al.*, 2011) y por tanto adecuado por este tipo de análisis.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando la ADN polimerasa de Biotools en un volumen de reacción de 25 µl que contenía: 0,75 U de polimerasa, el correspondiente tampón 1x, 200 µM de dNTPs, 0,32 µM de cada cebador (L_3.14 y R_3.14) y ≤1 µg ADN. Los parámetros de cada reacción fueron: desnaturalización inicial de la doble hélice de ADN a 94°C durante 5 min, 30 ciclos de 94°C durante 30 s, seguidos por 30 s a 54°C y 1 min y 30 s a 72°C, completados con un paso de elongación final de 7 min a 72°C. Los cebadores utilizados se aparean a las regiones de los exones 31 y 32 que flanquean el intrón 31 del gen *cdh* (Bel y Escriche, 2006). Para validar este marcador se calculó el nivel de heterocigosis observado (Ho) en el grupo de individuos parentales (sin seleccionar) y se comparó con el nivel de heterocigosis esperada (He) según la ley de Hardy-Weinberg, que se calculó de esta forma:

$$He = 1 - \sum_{i=1}^K p_i^2$$

Donde k es el número de alelos en el locus y p_i es la frecuencia del alelo i en el locus. La frecuencia alélica observada en el grupo de larvas supervivientes al ensayo con Cry1Ab y la frecuencia en las larvas no seleccionadas pertenecientes a las mismas aislíneas se compararon con test del Chi-Cuadrado.

3.11.3 Detección de transcritos

La detección de los transcritos de las *On*APNs en los diferentes estadios larvarios se llevó a cabo utilizando la técnica de RT-PCR compuesta por dos pasos:

transcripción reversa ó retrotranscripción, y PCR. El primer paso de retrotranscripción del ARNm a ADNc se realizó utilizando la RT polimerasa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se utilizó 1 µg de ARN total. En el segundo paso de amplificación por PCR se utilizó 1 µl de ADNc como molde y se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 3.11.2, utilizando la ADN polimerasa de Biotools y variando la Tm en función de los cebadores utilizados. El gen que codifica para las subunidad S3 de la proteína ribosomal de *O. nubilalis* (GenBank DQ988989) se utilizó como control positivo. Los cebadores específicos escogidos para los genes *onapn1*, *onapn2*, *onapn3b*, *onapn8* y *rps3* se apareaban en las regiones flanqueantes de un intrón de forma que producían bandas de tamaño diferente dependiendo de si el molde era ADN genómico o ADNc. Con esta estrategia, el tamaño de los amplificados se utilizó como control para descartar posibles contaminaciones de ADN en la preparación de ARN. Se utilizaron tres larvas de cada edad y cada amplificación se repitió 3 veces.

3.11.4 Amplificación Rápida de Extremos de ADNc (RACE-PCR)

La amplificación de las secuencias codificantes para las *OnAPNs* se llevó a cabo utilizando el kit SMART™ RACE cDNA Amplification (Clontech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la incorporación del oligo SMART™ en los extremos de las cadenas de ADNc recién sintetizados complementarios a los ARNm de interés. Los cebadores empleados para la amplificación de las secuencias codificantes de los genes *onapn2*, *onapn3b*, *onapn8* y *onpsa* fueron diseñados basándonos en unas secuencias proporcionadas por el Dr. David Heckel (Max Planck Institute, Jena, Alemania), que habían sido obtenidas en amplificaciones de ADN genómico utilizando cebadores degenerados. Los cebadores para la amplificación de *onapn3a* y *onapn4* se crearon a partir de las secuencias parciales que habían depositadas en GenBank (APN3 EF103944; APN4 EF103945). Las reacciones de amplificación se pusieron a punto empleando diferentes Tm, utilizando un termociclador de gradiente (Mastercycler® gradient, Eppendorf) hasta encontrar la Tm óptima para cada pareja de cebadores (datos no mostrados). Los productos amplificados en la primera ronda de RACE-PCR se utilizaron como moldes para una PCR anidada, utilizando los mismos cebadores específicos y el cebador anidado universal proporcionado por el kit, según las instrucciones del fabricante.

3.11.5 Análisis cuantitativo de transcritos por PCR a tiempo real (RT-qPCR)

La cuantificación de los transcritos de las *OnAPNs*, tanto en los tejidos de las larvas de último estadio cuanto en los estudios de silenciamiento génico, se realizó por PCR a tiempo real (RT-qPCR). El diseño de los cebadores específicos se realizó empleando el programa Primer Express (Applied Biosystems). La especificidad de los cebadores se comprobó mediante ensayos preliminares y se observó que todas las parejas amplificaban una única banda del tamaño esperado (datos no mostrados). Cada muestra fue procesada de la misma manera: 2 µg de ARN total fueron tratados con DNasa I (1U/1µg ARN) (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, para degradar las trazas de ADN genómico residual. Tras este proceso 1,5 µg de ARN total fueron retrotranscritos a ADNc como se ha descrito en el párrafo 3.11.3. Los 0,5 µg de ARN total restantes se utilizaron como control negativo en la reacción de RT-qPCR. Tanto el ADNc, como el control negativo de ARN total, se diluyeron 7 veces. En los ensayos de RT-qPCR, que se realizaron utilizando placas de 96 pocillos, se utilizó el fluorocromo Syber Green (Applied Biosystems). El incremento de ADN en cada ciclo se reflejaba en el aumento proporcional de la fluorescencia emitida, que era detectada por el equipo StepOne Plus de Applied Biosystems. El volumen final de cada reacción fue de 25 µl y contenía: 12,5 µl del kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, 5 µl de ADNc diluido 7 veces y 0,3 µM de cada cebador. Los parámetros de la reacción de amplificación fueron los siguientes: 50°C 2 min, 95°C 10 min, luego 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Al final de la reacción de amplificación se realizó un paso de desnaturalización a 60°C para obtener la curva de disociación del producto amplificado y así confirmar la ausencia de amplificación de secuencias inespecíficas. Para normalizar los valores de expresión se utilizó como gen de referencia (un gen que se exprese siempre en forma igual en todas las condiciones analizadas) el gen de la subunidad 3S de la proteína ribosomal de *O. nubilalis* (definido en el párrafo 3.11.3). Comparando los valores de C_T (número del ciclo de PCR en el cual la fluorescencia de la muestra supera el umbral de detección) del gen a analizar y del gen de referencia, se obtuvieron los valores de ΔC_T . Para obtener los valores de la expresión de las *OnAPNs* en los tejidos larvarios, se hicieron tres replicas técnicas de tres muestras independientes por cada tejido. Los niveles de expresión relativa de las *OnAPNs* en los tejidos fueron calculados utilizando el programa REST® (Pfaffl *et al.*, 2002), utilizando el intestino como tejido calibrador. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$.

3.12 CLONACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN

3.12.1 Metodología general

Los fragmentos de ADN a clonar, procedentes de PCR o de digestión enzimática y mayores de 100 pb, se purificaron de dos formas según si se obtuvo uno o más fragmentos. En el caso de un único fragmento se utilizó el kit High Pure PCR Product Purification de Roche. En el caso de varios, se separaron con un gel de agarosa al 1% (p/v) y la banda del tamaño específico se cortó del gel para la purificación del ADN contenido utilizando el kit Illustra GFX (GE Healthcare). Los fragmentos a clonar se insertaron en los plásmidos mediante una reacción de ligación catalizada por la ADN ligasa del fago T4 (Promega, Madison, WI, EEUU). El volumen total de cada reacción fue de 10 μ l y contenía 3 U de ADN ligasa, el correspondiente tampón 1x y 4 μ l de mezcla de plásmido e inserto en una relación molar de 1:3. La mezcla de ligación se incubó O/N a 19°C y se utilizó una parte de ésta para la transformación en *E. coli* e el resto se almacenó a -20°C.

Los insertos fueron secuenciados en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia.

3.12.2 Clonación de los productos de PCR

Los amplificadores de PCR purificados que se iban a secuenciar o a subclonar en plásmidos de expresión, se clonaron en primer lugar en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) (Figura 21). Este plásmido contiene las secuencias de los cebadores universales T7, Sp6, M13 directo y reverso en la región flanqueante al sitio de clonación múltiple. Estos cebadores fueron empleados en las reacciones de secuenciación.

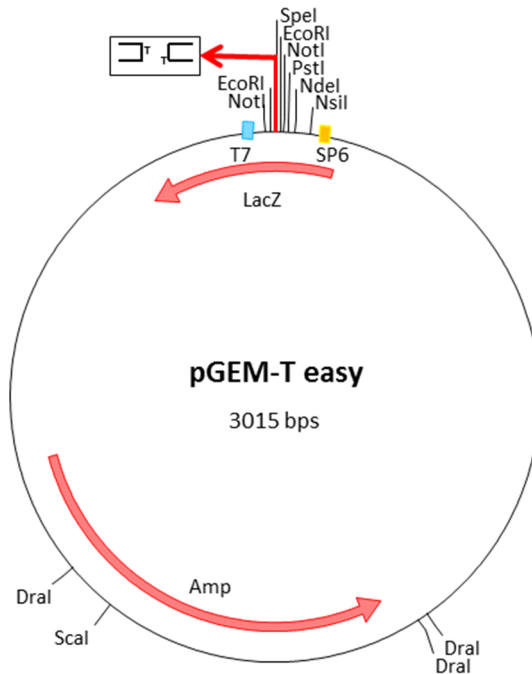


Figura 21. Mapa del plásmido pGEM-T Easy. Se indican los sitios de corte de diferentes enzimas de restricción usadas en nuestro trabajo de investigación, así como la posición de la secuencia de los cebadores T7 y Sp6. *lacz*: gen codificante la enzima β -galactosidasa, *amp*: gen para la resistencia a ampicilina.

3.12.3 Clonación de las *OnAPNs* en el vector pFBA_GFP_phX para su expresión en células de insecto

El vector pFBA_GFP (Figura 22) se basa en el vector pFastBac Dual (Invitrogen) que contiene dos promotores virales en un único vector para la expresión simultánea de dos proteínas en células de insecto. Ambos promotores, el de la poliédrina (P_H) y el de la proteína p10, son promotores fuertes que permiten altos niveles de expresión. El vector pFBA_GFP_phX nos fue proporcionado por el Dr. Salvador Herrero (Universidad de Valencia) y contiene un gen delator, el de la proteína verde fluorescente (GFP) clonado bajo el promotor p10. La expresión de la proteína GFP fue utilizada como marcador positivo de la transfección y de la infección.

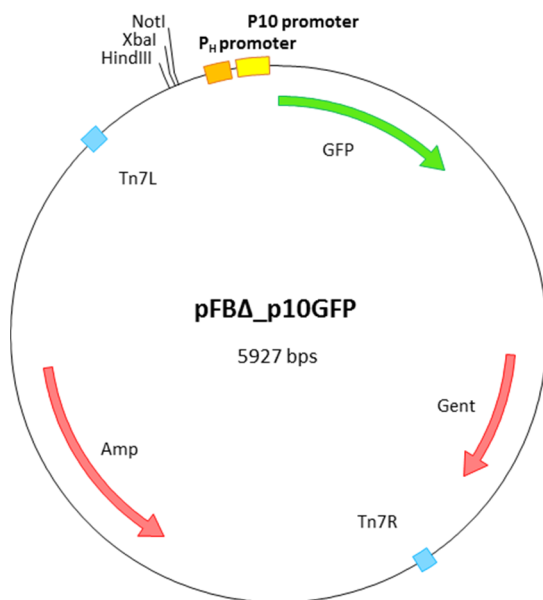


Figura 22: Mapa del plásmido pFBA_p10GFP_phX. Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción usadas en nuestro trabajo de investigación, así como la posición de la secuencia de los promotores p10 y P_H. Los cuadros azules indican los transposones mini-Tn7, necesarios para la recombinación específica de sitio y la inserción del casete de expresión en el báculo pMON14272. *gfp*: gen delator, *amp*: gen para la resistencia a ampicilina, *gent*: gen para la resistencia a gentamicina.

Las secuencias completas codificantes para las *OnAPNs* fueron amplificadas a partir de ADNc de intestino utilizando unos cebadores específicos que contenían un adaptador para la adición al extremo 3' de una secuencia codificante para una cola de histidina (Anexo 3). Después de su amplificación, fueron clonadas en el vector pGEM-T Easy (plásmidos resultantes nombrados pGEMOnAPN), secuenciadas y cortadas con enzimas de restricción para ser subclonadas en el vector pFBA_p10GFP bajo el promotor P_H. Las enzimas de restricción utilizadas para la clonación direccional de cada *OnAPN* en el plásmido pFBA_p10GFP_PhX están indicadas en la Tabla 6. El tamaño de las secuencias codificantes para las *OnAPNs* era muy similar al tamaño del plásmido pGEM-T Easy linealizado, por eso, además de las enzimas de restricción necesarias para la clonación, se utilizó también una enzima capaz de cortar en medio de dicho plásmido para poder discriminar entre las dos secuencias. Las digestiones se llevaron a cabo en dos reacciones de 50 µl. Primero se realizó una doble digestión, utilizando 60 U de cada enzima de restricción, el tampón específico 1x y ~ 5 µg de ADN total. Después de la purificación del ADN, se efectuó la segunda digestión

con 60 U μ l de enzima, el tampón específico y el ADN purificado. Ambas reacciones se incubaron a 37°C durante 3 h.

Tabla 6. Enzimas de restricción empleadas para la subclonación de las *OnAPNs*. Las secuencias codificantes de las *OnAPNs* se pasaron del plásmido pGEM-T Easy al plásmido pFBA_p10GFP_phX

Secuencia	Tamaño (pb)	Primera enzima	Segunda enzima	Corte en pGEM-T
pFBA_p10GFP	5927	<i>Not I</i> or <i>Hind III</i>	<i>Xba I</i>	-
<i>OnAPN1</i> , <i>OnAPN3a</i> , <i>OnAPN3b</i> , <i>OnAPN4</i>	2985, 3045, 3054, 2855	<i>Not I</i>	<i>Spe I</i>	<i>Dra I</i>
<i>OnAPN2</i>	2823	<i>Hind III</i>	<i>Xba I</i>	<i>Dra I</i>
<i>OnAPN8</i>	2778	<i>Not I</i>	<i>Spe I</i>	<i>Sca I</i>

3.12.4 Clonación de fragmentos de ADN en el vector pL4440 para la producción de ARN de doble cadena (ARNcd)

El plásmido pL4440 (Figura 23) contiene dos copias del promotor del gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, cada una con orientación opuesta respecto a la otra, separadas por el sitio de clonación múltiple (Timmons *et al.*, 2001). La transformación de este plásmido en una cepa bacteriana que contiene en su cromosoma el gen de la ADN polimerasa del fago T7 bajo un promotor inducible con IPTG permite la producción en gran cantidad de los dos ARNm complementarios, que se unen formando un ARN de doble cadena (ARNcd).

Unos fragmentos de la zona codificantes de los genes *onapn1* y *onapn2* (*OnAPN1_ds* y *OnAPN2_ds*) de un tamaño de 420 y 365 pb respectivamente, se clonaron en el vector pL4440 para ser utilizadas como molde en la producción de los respectivos ARNcd. Las secuencias fueron en primer lugar amplificadas a partir de los plásmidos pGEM*OnAPN1* y pGEM*OnAPN2* utilizando cebadores específicos que contenían secuencias diana para las enzimas de restricción necesarias para la clonación (Anexo 3). Las dos secuencias utilizadas no compartían ninguna región con más de seis nucleótidos seguidos en común. Las enzimas de restricción utilizadas en ambas clonaciones fueron *Pst I* y *Xba I*. La digestión del plásmido y de los insertos se llevó a cabo en dos reacciones secuenciales, de la forma descrita en el apartado 3.12.3. Los plásmidos recombinantes se secuenciaron para confirmar la identidad del inserto.

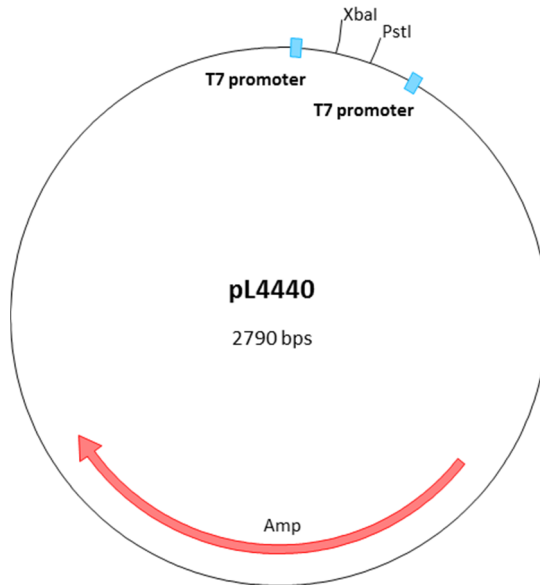


Figura 23. Mapa del plásmido pL4440. Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción usadas en nuestro trabajo de investigación, así como la posición de la secuencia de los promotores T7. *amp*: gen para la resistencia a la ampicilina.

3.12.5 Cepas de *E. coli* utilizadas para clonación y expresión

Las cepas de *E. coli* utilizadas a lo largo de este trabajo y sus genotipos fueron las siguientes:

- **DH10B** (Invitrogen): F' *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *endA1* *araD139* $\Delta(ara leu)$ 7697 *galU* *galK* *rpsL* *nupG* λ^- ;
- **XL2Blue** (Stratagene, Basel, Suiza): *endA1* *supE44* *thi-1* *hsdR17* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac* [F' *proAB* *lacI* $\Delta Z\Delta M15$ Tn10 (Tetr) Amy Cam^r];
- **DH10Bac** (Invitrogen): F' *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *endA1* *araD139* $\Delta(ara leu)$ 7697 *galU* *galK* λ^- *rpsL* *nupG*/pMON14272/pMON7124;
- **HT115**: W3110, *rcn14::Tn10* (Takiff *et al.*, 1989; Dasgupta *et al.*, 1998), proporcionada por el Dr. Juan Luis Jurat Fuentes (University of Tennessee, EEUU).

Las cepas DH10B y XL2Blue fueron utilizadas para la clonación y la multiplicación de todos los plásmidos recombinantes. La comprobación de las

colonias transformadas consistía en pipetear 20 µl de una solución Xgal/IPTG (Bioline, Berlín, Alemania) sobre la superficie de LB agar suplementado con el antibiótico correspondiente y solidificado en placas Petri, dejar secar y luego sembrar diluciones de la bacteria transformadas. Tras crecimiento O/N a 37°C, las colonias blancas se analizaban por PCR de colonia por confirmar la naturaleza de la secuencia insertada en el plásmido.

La cepa DBH10Bac contiene el báculo pMON14272 y el plásmido ayudante pMON7124. En el báculo pMON14272 se encuentran las secuencias de los extremos derecho e izquierdo del transposón Tn7 que también flanquean el casete de expresión de pFBA_p10GFP (Figura 22). Gracias a estas secuencias, seguidamente a la transformación de las células con uno de los plásmidos pFBA_p10GFP_phOnAPN1, pFBA_p10GFP_phOnAPN2, pFBA_p10GFP_phOnAPN3a, pFBA_p10GFP_phOnAPN3b, pFBA_p10GFP_phOnAPN4, pFBA_p10GFP_phOnAPN8 o pFBA_p10GFP, se producía una recombinación específica de sitio entre el báculo pMON14272 y el inserto del plásmido, resultando en la producción de báculos recombinantes que contenían el casete de expresión de los plásmidos pFBA_p10GFP.

La cepa HT115, deficiente para el gen de la RNasa III, fue transformada con los plásmidos pL4440_OnAPN1_ds y pL4440_OnAPN2_ds y utilizada para la producción de los correspondientes ARNcd.

3.12.6 Transformación de *E. coli* por choque térmico

Las células competentes se prepararon según el método descrito por Sambrook y Russell (2001) a partir de células de *E. coli* (cepas DH10B, XL2Blue, DH10Bac y HT115) crecidas en LB líquido a 37°C. Cuando el cultivo líquido alcanzó una OD₆₀₀ de 0,3 (fase de crecimiento exponencial), las células se incubaron en hielo durante 15 min y seguidamente se centrifugaron 10 min a 2800 x g a 4°C. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en CaCl₂ 0,1 M frío y se incubaron en hielo durante 30 min. Seguidamente se repitió el paso de centrifugación descrito anteriormente y, para finalizar, las células se resuspendieron en un pequeño volumen de CaCl₂ 0,1 M suplementado con glicerol 15 % (v/v), se alicuotaron y se congelaron con N₂ líquido para luego ser almacenadas a - 80°C hasta su uso.

Para la transformación de las células competentes, se añadió el plásmido a transformar (5 µl de mezcla de ligación o 1 µl de plásmido purificado) a 50 µl de

células previamente descongeladas y mantenidas en hielo. Se incubó en hielo durante 20 min, transcurridos los cuales se provocó un choque térmico incubando las células a 42°C durante 90 s, seguidos por 2 min en hielo. Las bacterias transformadas se incubaron 1 h a 37°C en LB líquido en agitación, luego se plaquearon en placas Petri de LB agar con el antibiótico apropiado y se dejaron crecer O/N a 37°C.

3.12.7 Electrotransformación de *E. coli*

El método de la electroporación (Sambrook y Russell, 2001) se empleó para clonar plásmidos de grandes dimensiones. Las células competentes (cepa DH10B) se prepararon creciendo a 37 °C en LB líquido sin NaCl hasta una OD₆₀₀ comprendida entre 0.6 y 0.9. Posteriormente, se incubaron 30 min en hielo, se centrifugaron a 2800 x *g* a 4°C durante 15 min y se resuspendieron en agua fría MilliQ, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en la mitad del volumen inicial de agua. Tras otro paso de centrifugación se resuspendieron en glicerol 10 % (v/v), para ser centrifugadas otra vez, y finalmente ser resuspendidas en un pequeño volumen de glicerol 10 % (v/v) y congeladas a – 80°C.

La electroporación se llevó a cabo en un electroporador *E. coli* Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU), con cubetas de 0,1 cm. Para ello, se mezcló 1,5 µl de ADN plasmídico o mezcla de ligación con 50 µl de células competentes, se incubó la mezcla en hielo durante 10 min y luego se electroporó a un voltaje de 1,8 kV. Tras la electroporación, la células se transfirieron a LB líquido, se crecieron primero 1 h a 37°C sin antibiótico y posteriormente en una placa Petri con LB y antibiótico a 37°C O/N.

3.13 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN EL SISTEMA DE BACULOVIRUS (Bac-to-Bac®)

Los baculovirus recombinantes se produjeron utilizando el sistema Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen) (Figura 24). Una vez transformados los plásmidos pFBA_Δp10GFP que contenían las secuencias codificantes para las *OnAPN* (apartado 3.12.3) en las células de *E. coli* DH10Bac, se identificaron las colonias que contenían los bácmidos recombinantes mediante PCR de colonia. Las colonias positivas se crecieron O/N a 37 °C en 4 ml de LB suplementado con kanamicina 50 µg/ml y gentamicina 7 µg/ml. Al día siguiente se procedió a la purificación de los bácmidos recombinantes: los cultivos se

centrifugaron a 14000 x *g* durante 1 min, se eliminó el sobrenadante, y el pellet se suspendió en 0,3 ml de solución I (Tris-HCl 15mM pH8, EDTA 10mM, RNasa A 100 g/ml). A continuación se añadieron 0,3 ml de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1% p/v), seguidos de 0,3 ml de acetato de potasio 3 M (pH 5,5) y los tubos se incubaron en hielo durante 10 min para la precipitación del ADN genómico y de las proteínas. El sobrenadante se separó del pellet con una centrifugación de 10 min a 14000 x *g*, se transfirió a otro tubo que contenía 0,8 ml de isopropanol y se incubó en hielo durante 10 min. El ADN bacmídico precipitado se recuperó tras una centrifugación a 14000 x *g* durante 15 min, y seguidamente se limpió con 0,5 ml de etanol 70% (v/v), y se centrifugó nuevamente a 14000 x *g* durante 5 min. El pellet se secó al aire, se resuspendió en 40 µl de agua destilada y se guardó a 4°C hasta su uso. La integridad de los bácmidos purificados se analizó en geles de agarosa al 1% (p/v).

La línea celular IPLB-Sf21AE, comúnmente llamada Sf21, es una línea celular continua procedente de ovarios de *S. frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977) y fue utilizada para la obtención y la amplificación de los baculovirus recombinantes y para la producción de las *OnAPN*. Las células Sf21 se mantuvieron a 25°C creciendo en forma de monocapa en medio Grace's (Gibco, Invitrogen, Gante, Bélgica) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de bovino (FBS).

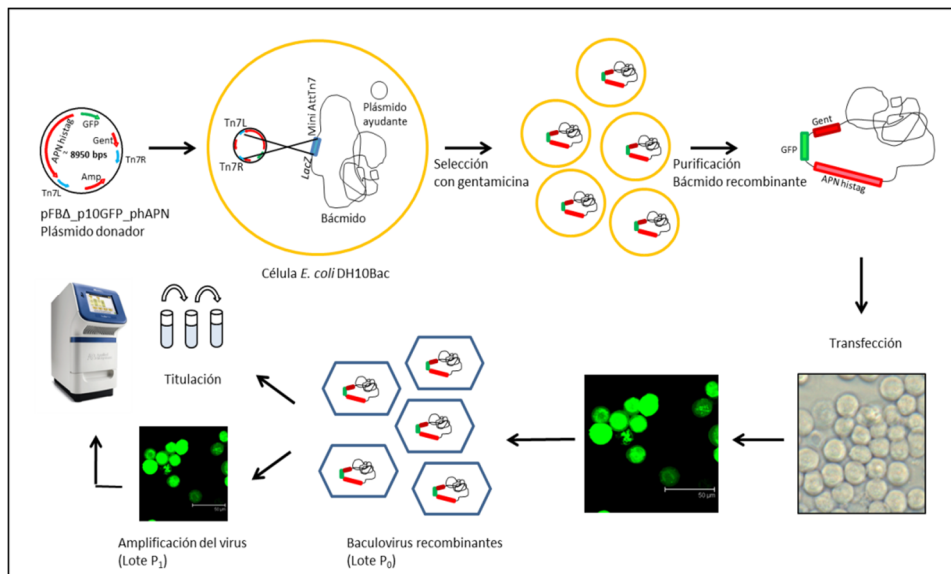


Figura 24. Esquema del proceso de obtención de baculovirus recombinantes empleando el sistema Bac-to-Bac®.

Los baculovirus recombinantes se obtuvieron tras transfectar las células Sf21 con los bácmidos recombinantes utilizando el reactivo GeneJuice (Novagen, Madison, WI, EEUU). Se mezclaron 0,5 µg de DNA bácmidico recombinante con 100 µl de medio Grace's y 6 µl de GeneJuice y se incubó a TA durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 800 µl de medio, y la mezcla se agregó sobre monocapas de células Sf21 crecidas en placas de seis pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/pocillo y que habían sido previamente incubadas en medio sin suero ni antibióticos durante 4 h. Las placas se incubaron durante 5 h a 27°C, luego se eliminó el medio de transfección y se agregaron 2 ml por pocillo de medio Grace's suplementado con 10 % (v/v) de FBS y una solución de penicilina y ampicilina (Invitrogen). Tras 5 días de incubación a 27°C, se verificó si la transfección había procedido correctamente, mirando la cantidad de células verdes (que expresaban GFP), utilizando un microscopio invertido de fluorescencia DMI3000 (Leica, Solms, Alemania). En caso afirmativo, el sobrenadante de cada pocillo se recolectó de forma estéril, se agitó vigorosamente con el vortex, se centrifugó a $7500 \times g$ durante 5 min a 4°C y se filtró con filtro de porosidad 45 µm. Los sobrenadantes filtrados, que contenían los baculovirus producidos tras la transfección, constituyeron los lotes de virus P₀. Utilizando 100 µl de estos lotes se infectaron células crecidas en botellas de 25 cm² a una densidad de 5×10^6 células/botella. A los 4 días, se volvieron a recoger los sobrenadantes, se centrifugaron a $7500 \times g$ durante 5 min a 4°C y se filtraron con filtros de 45 µm. Esta segunda preparación de virus dio lugar a los lotes P₁, que se utilizaron en todos los ensayos de producción de *OnAPN* recombinantes. Los lotes se conservaron a 4°C, al resguardo de la luz, hasta su uso. El título de los virus se determinó mediante RT-qPCR, utilizando como referencia preparaciones de diferentes concentraciones víricas conocidas (0 – 1 ng) (datos no mostrados).

La multiplicidad de infección (MOI, de su sigla inglesa multiplicity of infection) óptima para los ensayos se determinó en una placa de 24 pocillos, a donde se crecieron las células a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en 200 µl de medio. Estas células se infectaron con MOI 1, 3 y 10. A las 72 h post-infección (hpi), se comprobó por microscopia de fluorescencia el nivel de expresión de la proteína GFP alcanzado con cada MOI. Una vez comprobado el MOI ideal para infectar más del 90% de las células en 72 h, la expresión de las *OnAPN* se verificó de la siguiente forma: las células se recogieron y se centrifugaron a $600 \times g$ durante 10 min. Seguidamente, se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en 50 µl de PBS y se midió la concentración de proteínas totales por el método Bradford. Las

muestras se separaron por SDS-PAGE 10%. En cada carrera se cargaron 20 µg de proteínas totales del pellet y 20 µl de sobrenadante.

3.14 ENSAYOS DE ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA

En una placa de seis pocillos se crecieron las células Sf21 a una densidad de 2×10^6 células/pocillo, seguidamente se infectaron con los baculovirus recombinantes (MOI 3) y se recogieron 72 hpi, tras comprobar la correcta expresión de la proteína GFP en más del 90% de las células. El medio de cultivo se retiró, se limpiaron los pocillos con PBS, seguidamente se añadió 1 ml de PBS en cada pocillo y se recogieron las células, que fueron sedimentadas centrifugando a $600 \times g$ durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 100 µl de PBS y las proteínas totales fueron cuantificadas por el método Bradford.

La actividad de las OnAPNs fue determinada con tres diferente sustratos cromogénicos: leucina *p*-nitroanilida (leu-*p*NA) (Sigma), lisina *p*-nitroanilida (lys-*p*NA) (Sigma) y alanina *p*-nitroanilida (ala-*p*NA) (Sigma). Los ensayos se llevaron a cabo en placas ELISA de 96 pocillos. El volumen final de cada reacción fue de 200 µl y contenía: 40 mM de tampón Tris-HCl pH 7,5, 4 mM de sustrato y 2 µg de proteínas totales. La cinética de hidrólisis del sustrato se siguió en un lector ELISA Multiskan Ascent (Thermolab Systems, Whaltman, MA, EEUU) a una absorbancia de 405 nm, efectuando lecturas cada 10 s durante 5 min. Cada ensayo (con cada uno de los sustratos) se repitió independientemente tres veces, y como mínimo se hicieron tres replicas cada vez. La actividad del enzima se calculó con la siguiente fórmula basada en la ley de Lambert y Beer:

$$U/ml = \frac{(\Delta E/min) * V}{9,9 * cm * v}$$

Donde $\Delta E/min$ es el incremento de absorbancia en el tiempo (en minutos) que se obtiene del valor de la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal, V corresponde al volumen en ml de la reacción, v corresponde al volumen en ml de la muestra en la reacción, cm indica el paso de luz de la cubeta en centímetros y 9,9 es el coeficiente de extinción milimolar de la *p*-nitroanilina a 405 nm. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato por minuto. La actividad obtenida con los tres sustratos por cada isoforma de APN se comparó utilizando el test ANOVA seguido por el test *post hoc* de Bonferroni.

La sensibilidad de la actividad enzimática de las *On*APN a diferentes inhibidores se ensayó utilizando bestatina (Sigma), actinonina (Fluka, St. Louis, MO, EEUU) y el agente quelante EDTA. Para ello, se incubaron 10 µg de proteínas totales en un volumen final de 50 µl de tampón PBS con diferentes concentraciones de inhibidor, a TA durante 1 h. En el caso de la bestatina y de la actinonina se utilizaron dos concentraciones (50 y 500 µM), mientras que para el EDTA se ensayaron tres (1, 10 y 100 mM). La actividad de las *On*APNs tras la incubación se detectó utilizando el sustrato Leu-*p*NA, utilizando 2 µg de proteínas totales por reacción. Se hicieron tres repeticiones independientes por cada ensayo con cada uno de los inhibidores, y en cada ensayo se hicieron tres replicas como mínimo. La actividad de cada APN bajo diferentes concentraciones de inhibidor se comparó con el test ANOVA seguido por el test *post hoc* de Dunnett.

3.15 ENSAYOS DE INMUNOTINCIÓN

Las células Sf21 se sembraron en una placa de 24 pocillos en cuyos fondos se había depositado un cubreobjetos estéril (diámetro 15 mm). Se crecieron hasta una densidad de 5×10^5 células/pocillo, se infectaron con MOI 3 y se utilizaron para el ensayo 72 hpi, tras constatar la correcta expresión de la proteína GFP en aproximadamente el 90% de las células. El medio se eliminó de los pocillos y se lavaron con PBS. Las uniones inespecíficas se bloquearon durante 15 min con PBS y BSA 1% (p/v), se repitió dos veces el lavado con PBS y las proteínas se fijaron con PFA 4 % a TA durante 20 min. Seguidamente, se lavaron tres veces los pocillos con PBS y se volvió a bloquear con PBS y BSA 1 % (p/v) durante una hora. Entre las incubaciones, bien con toxina o con los anticuerpos, siempre se realizó un paso de limpieza con PBS. Las células se incubaron con Cry1Ab o Cry1F a una concentración de 3 µg/ml en PBS BSA 0.1% (p/v) durante dos horas. Después se incubaron con anticuerpo específico anti Cry1Ab o anti Cry1F a una concentración de 1:5000 durante dos horas, y seguidamente con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a rodamina (Millipore Biosciences, Temecula, CA, EEUU) diluido 1:200, durante 1,5 h. Tras el último lavado, las células se post-fijaron con PFA 2% y los pocillos se lavaron 3 veces con PBS. Los cubreobjetos se montaron en los portas con una gota de medio de montaje con el colorante de ácidos nucleicos DAPI Vectashield (Vector Lab., Burlingame, CA, EEUU). Las muestras se guardaron a -20 °C y se analizaron con un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Solms, Alemania).

3.16 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo con el kit *In vitro* toxicology assay de Sigma que se basa en la detección de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) que viene liberada tras la ruptura de las membranas celulares. Así, se crecieron células Sf21 en una placa de 24 pocillos hasta una densidad de 5×10^5 células/pocillo. Seguidamente se infectaron con los baculovirus recombinantes (MOI 3) y la citotoxicidad de las proteínas Cry se ensayó 72 hpi, después de comprobar la correcta expresión de la proteína GFP en más del 90% de las células. El medio de cultivo se retiró de cada pocillo y se sustituyó por 200 μ l de tampón PBS suplementado con las proteínas Cry1Ab o Cry1F a la concentración final de 50 μ g/ml (tampón PBS sin suplementar, en el caso del control). Las células se incubaron durante 3 horas a 27°C. Tras la incubación, se recogieron 60 μ l de sobrenadante de cada pocillo (donde se encontraba la actividad LDH liberada), se centrifugaron a 250 x *g* durante 4 min para sedimentar todas las células flotantes y se pasaron 50 μ l del sobrenadante a un pocillo de una placa para ELISA, a los cuales se añadieron 100 μ l de mezcla de reactivos del kit. Se incubó la placa en oscuridad a TA durante 30 min y se paró la reacción añadiendo 15 μ l de HCl 1 M. Las placas ELISA fueron analizadas en un lector de placa Victor 2 (PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU). En cada pocillo se detectó la reacción de la LDH midiendo la absorbancia producida a 490 nm restando el ruido de fondo a 690 nm.

3.17 SILENCIAMIENTO DE LAS *OnAPNs* MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA (ARNi)

En los ensayos de ARNi en *O. nubilalis* se utilizaron ARNcd de diferentes procedencias: producidos mediante transcripción *in vitro* o mediante fermentación bacteriana. Las moléculas de ARNcd se administraron a las larvas mediante diferentes métodos: por inyección, alimentando las larvas con bacterias que expresan ARNcd o por vía oral suministrándoles gotas de ARNcd purificado. El nivel de expresión de los genes después del suministro de ARNcd se midió por qRT-PCR, como se ha descrito en el apartado 3.11.5. En la figura 25 se pueden apreciar las zonas de los genes *onapn1* y *onapn2* utilizados para el diseño de los ARNcd en los diferentes ensayos de interferencia.

3.17.1 Preparación de ARNcd

Para la preparación de ARNcd *in vitro*, específico para al gen *onapn1*, un fragmento de 445 pb (Figura 25) se amplificó por PCR y se clonó en el vector

pGEM-T Easy. Las colonias de *E. coli* DBH10 transformadas se analizaron mediante PCR de colonia para confirmar la presencia del plásmido recombinante y discriminar entre las dos posibles orientaciones del inserto. Un clon positivo para cada orientación se secuenció para confirmar la identidad y estos dos plásmidos se utilizaron para la preparación *in vitro* de los dos ARN complementarios, que se fusionaron en una molécula de ARNcd, utilizando el kit Megascript® T7 (Ambion, Austin, TX, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARNcd obtenido se purificó con el kit RNA Megaclear™ (Ambion, Austin, TX, EEUU). La integridad y la pureza del ARNcd se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) y la concentración se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm. Como control negativo, se sintetizó un ARNcd no específico, utilizando el gen *creg* de *H. armigera* como molde.

```

APN1 : ATGGCACGCCTCCTGGTACCTTTGCTGCGCGGGGTTGCTCCCTCCAGGGCTPAGCCTTCATCCGTTACGGTCTCAGAGGAGAAAGAGGCATGG : 100
APN2 : -----ATGGTACTCTCTCAATAG-----CCTTAATCGCTCCGGTGTAGC--CAGCCAGATAT--TCAGAGGATTCGCCGATGTA : 76

APN1 : AFAAATTCAGCAGGGAGATGACACAGGCTCTTTCCGAGTCCCGGCGGACCGCCCTGCACTATGAACTCTCCCTGACAGCCAGCTTGGAGAGCGA : 200
APN2 : CCAATTCAGCAGCTGGACACATACAT-----CATACCGAGAGAACATACCCACCTTCTATGA-----TGTCACTCTCTCTGATCGA : 159

APN1 : AGAAGAGCCCTTCCCTTTCATGGAACAGTCCGCACTACCCGACCGCAGGAGAGATGTCCTCGAATTCGAAATTCGACAGCTCCATGATCTCCTCAAT : 300
APN2 : TGCTTC--CCAAGTACTCTATGCGCGGGTCTCATTC-----AGATCCGATCCCTACATACCGACCAAGCTCAATGCTCCAGAGCCATGGA-----CATG : 249

APN1 : CAGACTTCTGCTGAGGACACAGCGCGGAGGGTGTGCTTCACATATGCTTCCTCCAGCCTTCAGGTGTGAGAGCTCTCCATGAGGCTTCTGAGAA : 400
APN2 : GAATTTTAAATATGAGTCTTACAGCTTTTAAACACAGACT--GCGATATTTTCCAAACATCTTCTCTCCACGGATGACCTCCCTC--TTCCTGAGAA : 346

APN1 : TTGGCAGCGTAGGCGCTGCTCAGTGGGACAGTACATGACAG--ATCGACCTTCACTGGCAATCTGCAATCAATATGAGGGGCTTACAGAGT : 499
APN2 : TTTTCCAGATGAGCCATATGCTCCCAATCACTTTTAAAGACACATGAGACTTACAGTCAATACCTTCCAAAFARGTTGGTATTCAGCTTCGA : 445

APN1 : GGTACAG--AGAGCG--CACACACACAGATGGATGGCCACCACTCAGCTCCCAACCTGGGATCGGCGGGCAGCTTCCCTCCCTGATGAGAGCCGCGCT : 596
APN2 : GGTACAGCAGCGCGCGCTGGCCACAGTGAAGTGGCCACCACTCAGCTCCCAACCTCACATTCGCTCCAGGGCGGTTCCCTCCCTGATGAGAGCCGCGCT : 545

APN1 : CAGGGCTCTTCAGACTTACCGTTCACCGTGGAGGAGCGCTTACTGCTCCAGCTCTCACTGCGCTTAAACATGAGAGCTCCATGTA--TGGC : 694
APN2 : CAGAGCTTTTTCGAGCTACCACCTAGCTCCCTCCTGCTGCTACCGGCTGCGAAGCAACATGCCCTTGGAAATGAGACCACTTACCTGTAATGCT : 645

APN1 : GATATCCGAAGCTT--TCCACAGACTCCTATCAGCTCAGTACCTTGCCTTCCATTCACGCTCCCAATTCAGAGTGGG--GAAATCAGCA : 784
APN2 : GATGGGTAAACCTGAGCTCCAGACTCTCGACTCTGACTTATCTCCAGGCTTACCTCGCTCTCTAGCTTCGAGATTCAGTCACTAGTAAAGAAATGAC : 745

APN1 : AGGATGAGATAGACCTTTTGACATCTATGCGCGGACAAATGCCATGGAACCGGCTCATGGTCTTAGAATGGGATGAGCTTCAGAGGCAATGA : 884
APN2 : CATCTACAGAGTTCCTCTCAGACTTATCTCCAGGCTCGGACCGATTCCTGATTCGCTTGGACTTGGACAGAAACATGATCGCTTGGG : 845

APN1 : GAATFACCTGTTTACCTTTCTCAGGAGGAGAAAAATFACCTGACAGAGCTGCTTTCCTGATTTCAACCGCGGCTATGGAACTGGGCT : 984
APN2 : GAATFACCTGAGACTCC--CTTCTCCCTCC--FAGGCTGCTTAACTGACCTTCTCTGATTTGCGGGCGGCTATGGGAACCTGGGGA : 933

APN1 : CTTTGGCTTACAGAGAGCCCTTAACTCTTACCGCCCTCTCAACTCCACCAGTTTACAG--CAGCGTGAACCAATATGGGCTCCACCCAGAGATTGCC : 1083
APN2 : CTGGCTTTTACAGAGAAATGGCCCTCT--TGTCTGAGGCTGACACCACCCACCTTCAACAATTTGTCGATATGTCGATATGCTCCACGAGAACATG : 1032

APN1 : CACATGCTGTTGGGAAGCTCTGCTACCTGGCGCGGGTGGGAGACCTGCGGCTCAACGAGGGCTTCGGCCCTTCTCATCACTCTTACCGGTTCTG : 1183
APN2 : CACATGCTGTTGGGAAGGAGTGGGCGCTTACCTGCTGACCTTACCTGGCTCAACGAGGGTTTCGGAATCTCTCTGAGACTTCTGCTACCCATCTG : 1131

APN1 : TTGCACAGAGCTGGATATGAGAGAGATTCAGGTTGAGAGGTACACAGCCCTTTCTCAGTGGATGAGTGAACCTGCTGAGCGGATGACCAACCC : 1283
APN2 : GAATACCCCACTGGCGGATGTACACCT--ACTGTATGCTGACAGTAACTTATTCAGTCTGATGCGGACTGAGGTGAGCCCATGAGAAACCC : 1229

```


* 3020

APN1 : AGGGTCTCTATTAATCTAATTAGTTAA : 2985
APN2 : ----- : -

Figura 25. Alineamiento de las secuencias codificantes de los genes *onapn1* y *onapn2*. En verde está subrayada la zona de *onapn1* que se utilizó para diseñar el ARNcd producido *in vitro* y suministrado por inyección. En rojo están evidenciadas las zonas de *onapn1* y *onapn2* utilizadas en la preparación de los ARNcd producidos por fermentación bacteriana suministrados por vía oral.

La producción de ARNcd por cultivo bacteriano se realizó en la cepa HT115 de *E. coli*, que expresa la polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible y que es deficitaria del enzima RNasa III (que cataliza la hidrólisis del ARN de doble cadena). Las bacterias fueron transformadas con los plásmidos pL4440_*OnAPN1_ds* y pL4440_*OnAPN2_ds* (apartado 3.12.4) (en la figura 25 se puede apreciar la secuencia elegida de cada gen). Las bacterias transformadas se crecieron en placa Petri sobre LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (12,5 µg/ml) 24 h a 37°C. Una colonia aislada se utilizó para inocular un precultivo líquido de 5 ml de LB que creció 12 h a 37°C en agitación suave en presencia de ampicilina y tetraciclina. El precultivo se diluyó cien veces en 50 ml de LB con ampicilina 50 µg/L y se dejó crecer a 37°C en agitación suave hasta una OD₆₀₀ de 0,5. En ese momento la producción de ARNcd se indujo añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo se dejó crecer a 37°C durante 4 h. La biomasa obtenida fue recogida mediante centrifugación a 6000 x g durante 5 min a 4°C, posteriormente resuspendida en 2,5 ml de SDS 0,1 % e incubada a 99° durante 2 min para la lisis de las bacterias. El ARN de cadena sencilla se eliminó incubando las células lisadas 10 min a 37°C con 50 µl de RNasa A (Invitrogen) en presencia del tampón SSC 2x (NaCl 300 mM, Na₃C₃H₅O(COO)₃ 30 mM, pH 7,5). El ARNcd fue purificado utilizando 10 ml del reactivo RNAzol (MRCgene, Cincinnati, Ohio) siguiendo las instrucciones del fabricante y resuspendido en 50 µl de agua MilliQ. La integridad y la pureza del ARNcd se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% y la concentración se determinó por espectrofotometría utilizando un Nanodrop ND100 (Thermolab Systems, Whaltman, MA, EEUU).

3.17.2 Suministro de ARNcd

El efecto del ARNcd sobre la expresión de las *OnAPNs* en larvas de *O. nubilalis* fue probado mediante tres protocolos de suministro diferentes. En primer lugar, el ARNcd producido *in vitro* fue inyectado en larvas de *O. nubilalis*, procedentes de la colonia LAB, a comienzo del quinto estadio (menos de 24 horas tras la última muda), utilizando una jeringuilla de insulina. Se pinchó en la parte

dorsal de las larvas y se inyectaron 10 μl por individuo, conteniendo una cantidad total de 5 μg de ARNcd. El ARNcd específico contra *onapn1* se suministró a un total de 14 individuos, y se utilizó el mismo número de larvas para el suministro del tratamiento control (ARNcd no específico). Los niveles de expresión de *onapn1* se cuantificaron por qRT-PCR a las 72 h después de la inyección, utilizando el tejido intestinal para la purificación de ARN total como se ha descrito en el apartado 3.10.2.

Alternativamente, se realizaron ensayos de silenciamiento mediante suministro vía oral de gotas (volumen de 0,2 μl) de una solución de ARNcd, utilizando larvas de 13 y 14 días de edad, procedentes de los laboratorios Benzon Research y Lee French, que se habían dejado en ayunas durante 24 h. Se hicieron pruebas con a dos cantidades diferentes de ARNcd: 60 ng (larvas de Benzon Research) y 1200 ng (repartidos en dos suministros diarios de 600 ng cada uno) (larvas de Lee French). A cada larva control se le suministraron 0,2 μl de agua MilliQ. A cada gota se añadió azul de Comassie 0,1%, para poder visualizar la ingestión del líquido por parte de las larvas. Tras el tratamiento, las larvas se individualizaron y se alimentaron con dieta artificial. A las 72 h las larvas tratadas fueron sacrificadas para purificar el ARN total a partir del intestino y así medir los niveles de expresión de *onapn1* y *onapn2*.

A otro grupo de larvas (Lee French), también de 14 días de edad, les fue suministrado ARNcd previamente incubado con Celfectina (Invitrogen), un vector lipídico comúnmente utilizado en la transfección de células. Se incubaron 4 μl de Celfectina con 50 μl de agua MilliQ durante 30 min a TA, trascurridos los cuales se añadió un volumen de ARNcd. La concentración final del ARNcd utilizado en este ensayo fue de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Cada larva fue alimentada con una gota de 0,2 μl (correspondiente a 600 ng de ARNcd) teñida con azul de Comassie 0,1%. Seguidamente, se mantuvo durante 72 h en dieta normal en pocillos individuales. Los niveles de expresión de *onapn1* y *onapn2* se midieron como se ha descrito anteriormente.

Otra técnica empleada, consistió en alimentar las larvas de *O. nubilalis* de 7 días, compradas a los laboratorio Lee French, con bacterias que expresaban ARNcd. El suministro de las bacterias se realizó a lo largo de una semana, en bandejas de bioensayos con pocillos de 2 cm^2 de superficie que contenían dieta artificial solidificada. Cada día, se inoculaba un cultivo de 55 ml de LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) utilizando un precultivo crecido la noche anterior (apartado 3.17.1). El cultivo se dejaba crecer a 37 °C en agitación constante hasta una OD_{600} de 0,5, en

ese momento se inducía con IPTG 1 mM y se volvía a crecer durante 2 h. Para confirmar la correcta producción de ARNcd, 5 ml de cada cultivo se utilizaban para la purificación de ARN total. Las células bacterianas se recogían por centrifugación a 2800 x *g* durante 10 min y se resuspendían en 500 µl de agua estéril (concentración 100x respecto al volumen de cultivo inicial). Antes del uso, las bandejas se irradiaban con rayos UV durante 10 min, al fin de esterilizar la superficie de la dieta. Se dispensaban 50 µl de la solución bacteriana 100x en cada pocillo para contaminar la superficie de la dieta. Seguidamente se dejaban secar las placas en la campana de flujo laminar y se ponía una larva por pocillo. Cada día se pasaron las larvas a pocillos nuevos con dieta contaminada con bacterias frescas que expresaban ARNcd. Se utilizaron 5 larvas para cada tratamiento y como control se utilizó un cultivo de *E. coli* HT115 transformado con el plásmido pL4440 vacío. Los niveles de expresión fueron analizados 24 h después del último suministro, tras la purificación del ARN total a partir de intestino.

3.18 PROGRAMAS BIOINFORMATICOS Y BASES DE DATOS

Los siguientes programas se utilizaron para el análisis de secuencias nucleotídicas:

- **EditSeq** (DNASTar, Madison, WI, EEUU): visualización de secuencias, identificación de ORF, traducción a secuencias proteicas;
- **SeqMan** (DNASTar, Madison, WI, EEUU): ensamblaje de contigs;
- **MapDraw** (DNASTar, Madison, WI, EEUU): análisis de restricción *in silico*;
- **CloneManager** (Sci-Ed Software, Cary, NC, EEUU): simulación de clonaje y dibujo de mapas de plásmidos;

Los siguientes programas se utilizaron para la búsqueda de motivos conservados en las proteínas y para análisis filogenético:

- **Prosite** (<http://www.expasy.ch/prosite/>): búsqueda de dominios proteicos;
- **SignalP** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>): identificación de péptido señal;
- **GPI-SOM** (<http://gpi.unibe.ch/>): búsqueda de motivos de anclaje a GPI;
- **NetNGlyc 1.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>): identificación de sitios de N-glicosilación;
- **NetOGlyc 3.1** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1/>): identificación de sitios de O-glicosilación;

- **Clustal X** (Thompson *et al.*, 1997): alineamiento de secuencias y elaboración de árboles filogenéticos;
- **Treeview**: visualización de árboles filogenéticos;
- **Genedoc**: visualización y análisis de alineamientos, preparación de tablas de homología;

Los siguientes programas fueron utilizados para realizar la toma y análisis de imágenes.

- **Leica Confocal Software (LCS lite)**: programa de captación y tratamiento de imágenes de microscopia confocal;
- **Image J**: programa de adquisición, procesado y análisis de imágenes.

Las bases de datos utilizadas fueron:

- **GenBank** (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/);
- **Silkworm genome database** (<http://silkdb.org/>);
- **B. mori microarray database** (<http://silkworm.swu.edu.cn/microarray/>);
- **Bt toxicity specificity database** (<http://www.glfrc.forestry.ca/bacillus/>).

Los análisis Probit de los valores de mortalidad obtenidos con los bioensayos se realizaron el programa POLO-PC (LeOra Software, Berkley, CA, EEUU). El resto de los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EEUU).



RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE RESISTENCIA A LAS PROTEÍNAS Cry EN *O. nubilalis*

4.1.1 Análisis de la susceptibilidad basal de una colonia de campo

4.1.1.1 Ensayos de mortalidad

Los ensayos de mortalidad con la colonia PH, fundada con insectos recolectados en invernaderos periódicamente tratados con productos insecticidas basados en Bt, y con la colonia de laboratorio LAB, que nunca había estado expuesta a las toxinas de *B. thuringiensis*, evidenciaron que, a nivel de protoxinas, la proteína Cry1Ac era la más tóxica para ambas colonias, seguida por las proteínas Cry1Ab y Cry1Aa, mientras que la protoxina Cry2Aa resultó ser la menos activa (Tabla 7). La comparación de las rectas de mortalidad obtenidas para cada protoxina con el análisis Probit mostró que las dos colonias respondieron de la misma forma a todas las proteínas ensayadas, ya que las rectas obtenidas eran paralelas. Por el contrario, los valores de CL₅₀ y CL₉₀ obtenidos para las protoxinas de la clase 1A resultaron ser significativamente diferentes, indicando la existencia de variabilidad a nivel de susceptibilidad basal. La colonia LAB fue alrededor de entre 4 y 6 veces más susceptible hacia las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, ensayadas en forma de protoxinas, o sea la forma en la cual las proteínas Cry se encuentran en los formulados comerciales, los cuales contienen una mezcla de esporas y cristales. Sin embargo, los resultados de toxicidad obtenidos con la protoxina Cry2Aa (la menos tóxica) resultaron parecidos entre ambas colonias.

Los valores de mortalidad obtenidos en los ensayos con las proteínas Cry activadas con tripsina (Tabla 8) mostraron un patrón parecido a los resultados obtenidos con las protoxinas, aunque las diferencias en susceptibilidad entre las dos colonias fueron menores, excepto en el caso de la proteína Cry1Ac. Esta resultó ser la proteína con mayor actividad insecticida, seguida por la Cry1Aa y la Cry1Ab, mientras que la Cry2Aa fue la menos activa. La colonia PH resultó ser dos veces más tolerante hacia las proteínas Cry1Aa y Cry1Ab y 5 veces hacia la Cry1Ac con respecto a la colonia LAB. Por el contrario, la colonia PH fue alrededor de 2 veces más susceptible para la proteína Cry2Aa.

Tabla 7. Valores de CL₅₀ obtenidos en los ensayos de mortalidad con las protoxinas Cry para las colonias PH y FRA de *O. nubilalis*

Proteína	Colonia	n	CL ₅₀ ^a (LC ₉₅)	CL ₉₀ ^a (LC ₉₅)	Pendiente ± SE	χ ²	gl	Ratio PH/LAB
Cry1Aa	PH	380	109 (56 – 269)	1030 (377 – 9650)	1,3 ± 0,1	42,8	12	5,9
	LAB	500	18 (5,4 – 38)	214 (98 – 842)	1,2 ± 0,1	11,7	5	
Cry1Ab	PH	633	50 (24 – 96)	852 (366 – 3740)	1,0 ± 0,1	30,6	14	4,2
	LAB	510	12 (4,6 – 27)	210 (81 – 1130)	1,0 ± 0,1	44,2	13	
Cry1Ac	PH	310	16 (12 – 22)	95 (64 – 164)	1,7 ± 0,2	5,8	6	5,0
	LAB	380	3,4 (1,9 – 5,1)	16 (11 – 29)	1,9 ± 0,3	0,8	6	
Cry2Aa	PH	256	520 (166 – 2973)	4421 (1189 – 712059)	1,4 ± 0,2	22,2	5	NS ^b
	LAB	251	340 (142 – 813)	3942 (1439 – 35459)	1,2 ± 0,2	7,9	5	

^ang de proteína por cm²;

^bNS, el ratio de potencia de los valores de CL₅₀ no fue significativamente diferente.

Tabla 8. Valores de CL₅₀ obtenidos en los ensayos de mortalidad con las toxinas activadas Cry para las colonias PH y LAB de *O. nubilalis*

Proteína	Colonia	n	CL ₅₀ ^a (LC ₉₅)	CL ₉₀ ^a (LC ₉₅)	Pendiente ± SE	χ ²	GI	Ratio PH/LAB
Cry1Aa Bt ^b	PH	488	188 (123 – 299)	1776 (916 – 5339)	1,3 ± 0,1	6,1	5	2,0
	LAB	253	96 (60 – 145)	932 (554 – 1966)	1,3 ± 0,2	2,9	5	
Cry1Aa <i>E. coli</i> ^c	LAB	350	9,4 (5,7 -14,9)	169 (89 – 442)	1,0 ± 0,1	11,3	11	-
Cry1Ab	PH	371	28,3 (19,6 – 39)	220 (146 – 384)	1,4 ± 0,2	7,0	12	2,1
	LAB	477	12,1 (6,5 – 19,6)	163 (93 – 371)	1,1 ± 0,1	17,3	12	
Cry1Ac	PH	222	8,0 (3,3 -14,8)	113 (57 – 345)	1,1 ± 0,2	2,2	5	5,1
	LAB	364	1,5 (0,3 – 3,5)	22 (9,2 – 135)	1,1 ± 0,1	11,5	5	
Cry2Aa	PH	617	74 (41 -140)	1176 (499 -4865)	1,1 ± 0,1	13,2	12	0,4
	LAB	493	187 (107 -354)	1639 (741 -6707)	1,4 ± 0,1	41,2	12	

^ang de proteína por cm²;

^bproteína Cry1Aa producida a partir de una cepa recombinante de *B. thuringiensis* (Ecogen);

^cproteína Cry1Aa producida a partir de una cepa recombinante de *E. coli* (BGSC);

La proteína Cry1Aa activada se ensayó dos veces con la colonia LAB utilizando dos fuentes diferentes de obtención: *B. thuringiensis* y *E. coli*. Las rectas de mortalidad producidas por ambas proteínas resultaron ser paralelas, sin embargo la toxina producida por *B. thuringiensis* resultó ser alrededor de 10 veces menos activa respecto a la toxina producida por *E. coli*, indicando una variación importante de la susceptibilidad de *O. nubilalis* hacia proteínas con diferentes orígenes (Tabla 8). El valor de CL₅₀ obtenido con la colonia LAB para la proteína Cry1Aa activada producida en *E. coli* (Tabla 8) fue comparable al valor de CL₅₀ para la protoxina de la misma fuente (Tabla 7).

La capacidad insecticida del producto estándar HD-1-S-2005 para las larvas de las colonias PH y LAB resultó ser similar (Tabla 9). Los valores de CL₅₀ obtenidos para las dos colonias fueron 10 ng/cm² para la colonia PH y 7 ng/cm² para la colonia LAB. Las rectas de regresión obtenidas mediante el análisis Probit no resultaron paralelas (P < 0,05) por lo que no se pudo calcular la potencia relativa. Cabe señalar que los límites de confianza de los valores de CL₅₀ y CL₉₀ se solaparon sugiriendo que no había diferencias biológicamente importantes entre las dos poblaciones.

Tabla 9. Valores de CL₅₀ obtenidos en los ensayos de mortalidad con el producto estándar HD-1-S-2005 para las colonias PH y LAB de *O. nubilalis*

Colonia	n	CL ₅₀ ^a (LC ₉₅)	CL ₉₀ ^a (LC ₉₅)	Pendiente ± SE	χ ²	gl
PH	505	10,2 (6,7 – 14)	28,7 (20 – 58)	2,8 ± 0,4	7,0	5
LAB	253	7,0 (1,2 – 16)	65 (27 – 919)	1,3 ± 0,3	7,3	5

^a ng de peso seco por cm²

4.1.1.2 Ensayos de mortalidad funcional

La susceptibilidad a *B. thuringiensis* medida como mortalidad funcional fue analizada en las colonias PH y LAB utilizando las proteínas activadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa (Tabla 10), ya que en los bioensayos de mortalidad se observó un claro retraso en el tiempo de desarrollo de las larvas tratadas. Las proteínas de la clase Cry1A que habían sido las más tóxicas en los ensayos de mortalidad también fueron las más efectivas en provocar inhibición del crecimiento. También se evidenciaron diferencias entre los valores de mortalidad funcional en la colonia LAB para la proteína Cry1Aa producida por *E. coli* o por *B. thuringiensis*, siendo esta última alrededor de 9 veces menos activa, tal y como se había observado en los ensayos de mortalidad. Sin embargo, las diferencias en susceptibilidad entre la colonia PH y LAB evidenciadas en los ensayos de mortalidad con las proteínas

de la clase Cry1A (en el sentido de que la colonia LAB demostró ser más susceptible que la colonia PH tanto con protoxinas como con toxinas activadas) no se observaron en los ensayos de mortalidad funcional, donde los valores de mortalidad para las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac no resultaron ser significativamente diferentes. La única diferencia entre las dos colonias se observó con la proteína Cry2Aa. Las rectas de regresión obtenidas para cada una de las colonias mediante el análisis Probit con esta toxina no resultaron paralelas ($P < 0,05$). La comparación de los valores de CF_{50} indicó que la colonia LAB era 3,5 veces menos susceptible que la colonia PH a la toxina activada Cry2Aa y que esta diferencia aumentaba a 6,4 veces a nivel de CF_{90} .

4.1.2 Ensayo de selección con la proteína Cry1Ab en una colonia de campo

Una muestra poblacional de la generación F_2 de la colonia PH fue sometida a un proceso de selección en laboratorio utilizando como agente de selección la proteína de *B. thuringiensis* Cry1Ab activada. Dos procesos de selección se llevaron a cabo paralelamente utilizando la técnica de incorporación de la toxina en la dieta: parte de las larvas neonatas se seleccionaron con una concentración inicial de proteína Cry1Ab relativamente baja (0,2 $\mu\text{g/ml}$, "selección 1x") que se fue incrementando gradualmente, mientras que otra parte se sometió inmediatamente a una concentración de Cry1Ab muy alta (2 $\mu\text{g/ml}$, "selección 10x").

El ensayo de selección 1x se dividió en tres fases (F_0 - F_2 , F_3 - F_6 , F_7 - F_{12}). La concentración de proteína Cry1Ab activada incorporada en la dieta fue incrementándose llegando al final a la misma concentración utilizada inicialmente en la selección 10x (Tabla 11). En cada generación se registró el número de larvas que llegaban con éxito a la fase de pupa tras un mes entero alimentándose solamente con dieta suplementada con proteína Cry1Ab (Tabla 11). De forma general, pudo observarse un aumento del número de pupas recogidas tras cada ronda de selección en la primera fase de la selección 1x, luego la cantidad de pupas se mantuvo más o menos estable durante la segunda fase y, a excepción de la generación F_8 , fue bajando progresivamente en la tercera parte, llegando así a la última generación (F_{12}) en la que ya no se obtuvieron pupas.

En el ensayo 10x, la mayor parte de las larvas de la colonia PH-sel expuestas a la toxina en la primera generación seleccionada (F_0) no sobrevivieron a la alta concentración de Cry1Ab y en la segunda generación ningún individuo llegó a pupación (Tabla 11).

Tabla 10. Valores de CF₅₀ obtenidos en los ensayos de mortalidad con las toxinas activadas Cry para las colonias PH y LAB de *O. nubilalis*

Proteína	Colonia	N	CF ₅₀ ^a (LC ₉₅)	CF ₉₀ ^a (LC ₉₅)	Pendiente ± SE	χ ²	gl	Ratio PH/LAB
Cry1Aa Bt ^b	PH	365	40 (15,5 – 62)	132 (79 – 901)	2,5 ± 0,5	7,6	5	NS ^c
	LAB	375	31 (24 – 42)	154 (103 – 282)	1,9 ± 0,2	4,5	5	
Cry1Aa <i>E. coli</i> ^d	LAB	226	4,1 (1,9 – 7,8)	26 (12 – 145)	1,6 ± 0,3	6,9	5	-
Cry1Ab	PH	245	1,5 (0,6 – 2,5)	7,1 (4,3 – 17,4)	1,9 ± 0,5	2,7	5	NS
	LAB	246	2,1 (1,2 – 3,1)	10,0 (6,8 – 18)	1,9 ± 0,3	3,4	5	
Cry1Ac	PH	251	1,0 (0,5 -1,8)	7,2 (3,4 – 42,1)	1,5 ± 0,3	2,1	5	NS
	LAB	252	0,8 (0,4 – 1,7)	4,4 (2,0 – 29)	1,8 ± 0,3	7,8	5	
Cry2Aa	PH	253	17 (10 -24)	31 (22 -97)	4,7 ± 1,0	6,5	5	-
	LAB	253	60 (41 -85)	200 (127 -603)	2,5 ± 0,6	2,8	5	

^a ng de proteína por cm²;

^b proteína Cry1Aa producida a partir de una cepa recombinante de *B. thuringiensis* (Ecogen);

^c NS, el ratio de los valores de CF₅₀ no fue significativamente diferente;

^d proteína Cry1Aa producida a partir de una cepa recombinante de *E. coli* (BGSC);

Tabla 11. Progreso de la selección con la proteína Cry1Ab en la colonia PH-sel de *O. nubilalis*

Selección 1x		
Generación	Pupas recogidas ^a	Concentración Cry1Ab (µg/ml)
F ₀ Sel	285	0,2
F ₁ Sel	499	
F ₂ Sel	1022	
F ₃ Sel	373	1
F ₄ Sel	717	
F ₅ Sel	490	
F ₆ Sel	568	
F ₇ Sel	462	2
F ₈ Sel	700	
F ₉ Sel	159	
F ₁₀ Sel	41	
F ₁₁ Sel	47	
F ₁₂ Sel	0	
Selección 10x		
Generación	Pupas recogidas	Concentración Cry1Ab (µg/ml)
F ₀ Sel	10	2
F ₁ Sel	0	

^a Número de larvas que llegaron al estadio de pupa y que se utilizaron para obtener la generación siguiente.

El descenso en susceptibilidad a la proteína Cry1Ab en el ensayo de selección 1x se evaluó mediante la realización de ensayos de mortalidad en las generaciones 3, 5, 9 y 10 (Tabla 12) y comparando los resultados con los valores de CL₅₀ obtenidos en la población no seleccionada. Las rectas de regresión obtenidas en los ensayos mediante el análisis Probit ($P < 0,05$) no resultaron siempre paralelas, por lo que el ratio de resistencia (RR) fue obtenido utilizando el ratio de los valores de CL₅₀. Estos valores indican que tras la primera fase de selección incrementó la tolerancia hacia la proteína Cry1Ab casi 8 veces en la colonia seleccionada (aunque no se pudieron calcular los LC₉₅ para la colonia PH-sel 1x). El RR fluctuó entre 4,5 y 6,4 en las generaciones F₅ y F₉ mientras que en la generación F₁₀ (la cuarta de la fase 3, seleccionada con 2µg/ml de Cry1Ab activada) disminuyó a 0,3. Este momento coincidió con que la población empezó a dar señales de baja viabilidad,

con una disminución del número de pupas recogidas (Tabla 11) y un descenso en la puesta de los huevos (datos no mostrados), (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de CL₅₀ obtenidos en los ensayos de mortalidad con la proteína Cry1Ab durante el proceso de selección de la colonia PH-sel de *O. nubilalis*

Generación	Colonia	n	CL ₅₀ ^a (LC ₉₅)	CL ₉₀ ^a (LC ₉₅)	Pendiente ± SE	RR ^b
F ₃	PH	244	30 (21 - 43)	256 (154 - 524)	1,4 ± 0,2	7,7
	PHsel	128	230 (-)	2337 (-)	1,3 ± 0,2	
F ₅	PH	126	37 (9,2 - 76)	285 (135 - 1300)	1,4 ± 0,4	4,5
	PHsel	122	165 (60 - 429)	10,0 (2181 -188700)	0,7 ± 0,1	
F ₉	PH	127	22 (9,8 - 41)	185 (94 - 604)	1,4 ± 0,3	6,4
	PHsel	250	140 (56 - 327)	5261 (1621 - 54391)	0,8 ± 0,3	
F ₁₀	PH	128	30 (6,5 -82)	639 (199 -12821)	1,0 ± 0,2	0,3
	PHsel	98	8,8 (1,2 -22)	95 (36 -1545)	1,2 ± 0,3	

^a ng de proteína por cm²;

^b Ratio entre los valores de CL₅₀ obtenidos en la generación en estudio y en la colonia PH no seleccionada

4.1.3 Análisis genético cuantitativo de la tolerancia a la proteína Cry1Ab

Ciento diez isolíneas fueron establecidas por la Dra. Gema Farinós (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid) utilizando poblaciones de *O. nubilalis* derivadas de campos de maíz españoles. Cada isolínea empezó con un cruce individual entre un macho y una hembra, cada uno procedente de una colonia fundada con insectos capturados en la zona del delta del Ebro (E) o de la provincia de Badajoz (B). Cincuenta y tres parejas de las ciento y diez iniciales depositaron huevos suficientes como para realizar un cribado con una dosis discriminante de proteína Cry1Ab en la generación F₁ (Tabla 13). En esta generación, el porcentaje de mortalidad obtenido en cada isolínea varió grandemente, yendo del 24 al 100% (Figura 26) con una media del 87% (± 17%) (Tabla 13). En nueve isolíneas (17% del total) no se encontraron supervivientes después del tratamiento (100% mortalidad). La mortalidad observada en cada isolínea no resultó depender de la procedencia de los parentales (E x B o B x E), ya que no se evidenciaron diferencias significativas entre los dos grupos de cruces (B x E = 88 ± 16%; E x B = 86 ± 19%; test de Mann-Whitney, $U = 263$; $P = 0.1426$). La mortalidad media obtenida no se alejó de los valores esperados porque la concentración de toxina Cry1Ab utilizada hubiera tenido que matar al 90% de los individuos ensayados (Farinós *et al.*, 2004).

La utilización de una dosis tan alta de proteína Cry1Ab hizo que la distribución de las frecuencias de mortalidad recogidas en cada isolínea no siguieran una distribución normal, como evidenció el test de Shapiro-Wilk ($W = 0.7301$, $P < 0.0001$).

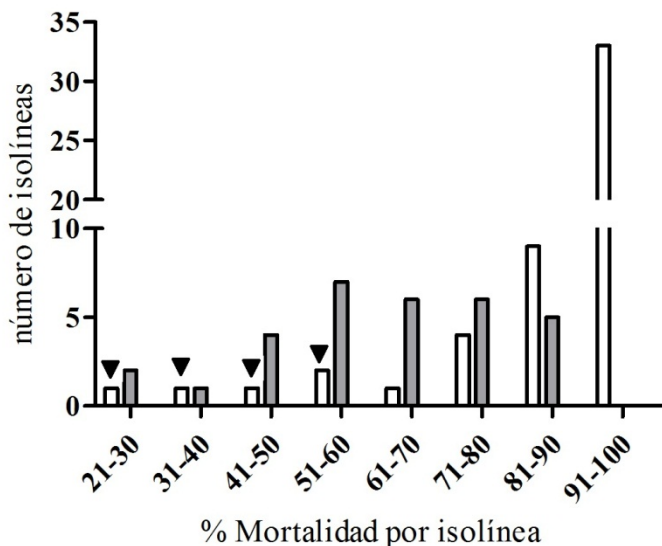


Figura 26. Distribución de mortalidad por isolínea en las generaciones F₁ y F₂. La mortalidad se evaluó transcurridos 7 días desde la exposición a la proteína Cry1Ab. Las columnas blancas representan la generación F₁ y las columnas grises la generación F₂. Las cabezas de flechas indican las isolíneas I_T (elegidas para la obtención de la generación F₂).

Los porcentajes de mortalidad recogidos en la generación F₁ variaron de forma continua desde el 70 hasta el 100% con la excepción de cinco isolíneas (#1, #7, #76, #81 #109) (Figura 26) que mostraron un porcentaje de mortalidad en la generación F₁ inferior al 60%. A estas isolíneas se les denominó isolíneas I_T. La mortalidad media de la generación F₁ en las isolíneas I_T fue de 44% ($\pm 14\%$ SD) significativamente más baja que la mortalidad media registrada para toda la generación F₁ (test de Mann-Whitney, $U = 14.5$, $P < 0.01$) (Tabla 13). La comparación entre estos dos datos nos sugirió que la tolerancia a Cry1Ab exhibida por la descendencia F₁ de las isolíneas I_T pudiera ser un rasgo genético seleccionable. Para verificar tal hipótesis, cruzamos los supervivientes de las isolíneas I_T para obtener la generación F₂ la cual se sometió a cribado con la misma concentración de proteína Cry1Ab utilizada para la generación anterior.

Para la obtención de la generación F₂ se realizaron un total de 52 cruces, de los cuales 31 pusieron bastantes huevos para bioensayar la progenie. Para las isolíneas #1 y #7 solamente fue posible realizar tres cruces cada una y ninguno

resultó ser fértil, así que en estas isolíneas no se pudo determinar la mortalidad de la generación F₂. En las subfamilias derivadas de las otras tres isolíneas se registraron porcentajes de mortalidad que variaron de forma continua desde 28 hasta 89% (Figura 26), con una media del 62% ($\pm 17\%$ SD), lo cual significa una reducción consistente de la mortalidad si se compara con la generación F₁ ($87 \pm 17\%$) (Mann-Whitney test, $U = 203$, $P < 0.01$) (Tabla 13). Además, la progenie F₂ de ninguno de los cruces mostró un porcentaje de mortalidad del 100% mientras que en la generación F₁ el 17% de las isolíneas no tuvo ningún superviviente. La distribución de las frecuencias de mortalidad en la generación F₂ resultó ser continua y a diferencia de la generación F₁, no se alejó de un modelo de distribución normal (test de Shapiro-Wilk, $W = 0.9712$, $P = 0.5526$). En general, estos resultados señalan un cambio en el nivel de tolerancia en una sola generación de selección, indicando una rápida respuesta a la presión de selección aplicada (Figura 26). Dentro de la generación F₂, el test ANOVA no evidenció diferencias significativas entre las medias de mortalidad de las subfamilias sib-I_T dependiendo de la isolínea de origen ($F = 0.1901$, $P = 0.347$), indicando una respuesta similar de todas las isolíneas I_T a la selección con Cry1Ab.

Tabla 13. Mortalidad de las larvas de *O. nubilalis* tras exposición a con 40 ng/cm² de proteína Cry1Ab.

	Cruces	Isolíneas sujetas a cribado	Larvas expuestas a Cry1Ab ^a	Mortalidad ^b
Generación F₁				
Isolíneas totales	110	53	6506 (123 \pm 58)	87 \pm 17 (24-100)
Isolíneas I_T^c	-	5	760 (152 \pm 42)	44 \pm 14 (24-56)
Generación F₂				
Subfam. Sib-I_T totales	52	31	3410 (110 \pm 50)	62 \pm 17 (28-89)
Subfam. Sib-I_T #76	15	11	1443 (131 \pm 51)	60 \pm 16 (29-87)
Subfam. Sib-I_T #81	20	15	1675 (112 \pm 45)	66 \pm 17 (28-89)
Subfam. Sib-I_T #109	11	5	292 (58 \pm 25)	55 \pm 16 (35-73)

^a entre paréntesis se indican media \pm SD por isolínea;

^b mortalidad media \pm SD (min – max) registrada 7 días tras la exposición a Cry1Ab;

^c Isolíneas con menos del 60% de mortalidad en la generación F₁, utilizadas para obtener la generación F₂ (subfamilias sib-I_T).

El límite más alto para la heredabilidad de la tolerancia a Cry1Ab se estimó en 0,90, utilizando el método descrito por Bull y colaboradores (1982), basado en la varianza entre isolíneas. Esto significa que hasta el 90% de la variación fenotípica de la tolerancia a la proteína Cry1Ab para esta muestra poblacional podía depender de la varianza genética heredable. Cuando se utilizó el método para la estimación de la heredabilidad basado en la respuesta a la selección, el resultado fue de 0.82. También en este segundo caso el ambiente podría influenciar la estimación, por lo cual este valor solamente puede representar el límite mayor. En conclusión, los valores obtenidos con los dos métodos son muy parecidos y nos permiten colocar el límite mayor para la heredabilidad de la tolerancia a Cry1Ab en nuestra población de *O. nubilalis* entre 0.82 y 0.90.

La aplicación de la fórmula de Lande nos permitió estimar el número mínimo de factores segregantes que influenciaban la tolerancia en nuestra población. Los resultados nos indicaron que este rasgo no estaba controlado por un solo factor si no por, al menos, dos *loci*, con efectos iguales sobre la tolerancia.

4.1.3.1 Segregación de los alelos del gen *cdh* en las isolíneas I_T

Las amplificaciones de los alelos del gen *cdh* se llevaron a cabo con la técnica EPIC-PCR en los diez parentales de las isolíneas I_T. Se identificaron cinco alelos (A, B, C, D y E) que mostraron polimorfismos de tamaño, así como un alelo que resultó en una amplificación nula (alelo N) (Tabla 14). El tamaño de los amplicones de los alelos A-E (discriminables por visualización en gel de agarosa) variaba de 758 a 1444 pb. La secuenciación de cada fragmento evidenció que las diferencias de tamaño eran debidas a inserciones y deleciones en el intrón. Cuando se compararon las secuencias de los alelos con la secuencia DQ000165 del gen *cdh*, depositada en GenBank, además de los polimorfismos en la zona intrónica, también se detectaron ocho mutaciones puntuales silenciosas en la zona exónica. Seis de los diez individuos analizados resultaron ser heterocigotos para el gen *cdh*. Este nivel de heterocigosidad observada del marcador EPIC-PCR para el gen *cdh* (0.6) no resultó ser diferente del nivel de heterocigosidad esperada según el equilibrio de Hardy-Weinberg, según el valor P calculado con el test exacto de Fisher (0,628). Cuando se analizaron las frecuencias de los genotipos del gen *cdh* en la descendencia de las cinco isolíneas I_T (Tabla 15) se observó que estas no se desviaban de los valores esperados según las leyes de Mendel, indicando una herencia mendeliana de estos marcadores, a pesar de que uno de los alelos no daba productos de amplificación (alelo N). Este hecho sugirió que la secuencia del alelo N no era ambigua y que estaba asociada realmente a un solo alelo. Este conjunto de

datos nos indicó que el marcador EPIC-PCR elegido era apropiado para el análisis de la herencia del gen *cdh* en las isolíneas I_T.

Tabla 14. Alelos de *cdh* amplificados por EPIC-PCR en los individuos parentales fundadores de las isolíneas I_T

Alelo	n° acceso en GenBank	Tamaño producto PCR	Tamaño intrón
A	HQ185401	1444 pb	1287 pb
B	HQ185402	1219 pb	1062 pb
C	HQ185403	1024 pb	867 pb
D	HQ185404	827 pb	670 pb
E	HQ185405	758 pb	601 pb
N	-	No amplificación	-

Una de las cinco isolíneas I_T (#7) se descartó porque su generación F₁ no fue informativa, ya que toda la progenie era heterocigota para los alelos N y C (Tabla 15). En el resto de las isolíneas I_T, se compararon las frecuencias de los genotipos entre los grupos de las larvas control y el de las larvas supervivientes al cribado con la proteína Cry1Ab, tanto en la generación F₁ como en la generación F₂. No se evidenciaron diferencias significativas ($P >> 0,05$) en ninguna isolínea, excepto que en la generación F₁ de la isolínea #1 ($P=0,027$) (Tabla 16), sugiriendo una asociación entre la segregación del gen *cdh* y la tolerancia a Cry1Ab en esta isolínea. Esta observación no se pudo confirmar con el análisis de la segregación en la generación F₂, ya que los cruces entre los adultos F₁ de la isolínea #1 no resultaron fértiles. El genotipo más abundante entre las larvas que sobrevivieron al cribado con Cry1Ab fue el CD. Cabe señalar que estos alelos C y D se encontraron también en los genotipos de las larvas pertenecientes a las otras isolíneas I_T en las que no se evidenciaron diferencias significativas en la segregación genotípica de la *cdh* entre grupo control y supervivientes, aunque nunca combinados en el genotipo CD.

Tabla 15. Frecuencias de los distintos alelos del gen *cdh* en las generaciones F₁ y F₂ de las isolíneas I_T

Isolínea/subfamilia	Generación (% mortalidad)	Genotipos P		Número de individuos		Genotipos Progenie	Frecuencia		valorP (gl) ^a	
		♀	x	♂	Control		Supervivientes	Control		Supervivientes
#1	F1 (58.8%)	AD	x	CC	20	20	AC CD	0.65 0.35	0.3 0.7	0.027 (1)
#7	F1 (37.1%)	NN	x	CC	10	10	CN	1	1	1 (1)
#76	F1 (56.3%)	DN	x	BN	10	22	BD BN DN NN	0.5 0.1 0.2 0.2	0.3 0.1 0.3 0.3	0.943 (3)
#81	F1 (23.8%)	CE	x	AB	10	30	AC AE BC BE	0.2 0.2 0.3 0.3	0.2 0.1 0.3 0.4	0.661 (3)
#109	F1 (44.3%)	AA	x	CN	10	10	AC AN	0.5 0.5	0.4 0.6	0.653 (1)
#76-P8 ^b	F2 (28.8%)	NN	x	DN	10	10	DN NN	0.3 0.7	0.4 0.7	0.639 (1)
#81-P11 ^b	F2 (27.6%)	AC	x	AC	10	10	AC AA CC	0.5 0.2 0.3	0.5 0.2 0.3	1 (2)
#109-P10 ^b	F2 (39%)	AN	x	AC	10	10	AA/AN AC CN	0.6 0.1 0.3	0.6 0 0.4	0.565 (2)

^a Valor P obtenido por el test del chi-cuadro, comparando los ratios genotípicos de las larvas del grupo control con los de las larvas supervivientes a la proteína Cry1Ab;

^b Subfamilias de la generación F₂ que derivan de cruces individuales entre adultos F₁ y que mostraron el porcentaje de mortalidad más bajo a dentro de cada isolínea I_T

4.1.3.2 Caracterización de la secuencia del gen *cdh* en la zona descrita de unión a las toxinas Cry

El análisis de la secuencia génica del gen *cdh* correspondiente a la zona más consensuada entre los diferentes autores para la unión a las proteínas Cry (zona TBR) (Griko *et al.*, 2007) se llevó a cabo para los alelos C y D. La amplificación de la región TBR se dividió en dos partes de alrededor de 900 y 1500 pb. Tras el ensamblaje de los contigs se obtuvieron dos alelos de 1991 y 1946 pb (número de acceso de GenBank: HQ214628 y HQ214629, respectivamente). Estos dos alelos contenían cuatro intrones cada uno y la diferencia de tamaño se debía a inserciones y deleciones en dichos intrones. No se observó ninguna inserción o deleción en las zonas codificantes. La comparación de estos fragmentos con la zona TBR de la secuencia AAY44392 depositada en GenBank evidenció más de 60 mutaciones puntuales (tanto en intrones como en exones). Cuatro mutaciones sobre las doce encontradas en la secuencia codificante fueron identificadas como mutaciones no sinónimas que provocaban un cambio de aminoácido (Figura 27). Las sustituciones aminoacídicas de Tyr¹³¹³ a Phe¹³¹³ (cambio de aminoácido polar a no polar) y de Ser¹⁴⁵⁸ a Thr¹⁴⁵⁸ (mutación neutra) se encontraron en un solo alelo mientras que otras dos sustituciones (de Arg¹²⁹⁶ a Ser¹²⁹⁶ y de Ala¹⁴⁰⁶ a Thr¹⁴⁰⁶ que provocaban un cambio de aminoácido básico o no polar a polar, respectivamente) se encontraron en ambos alelos.

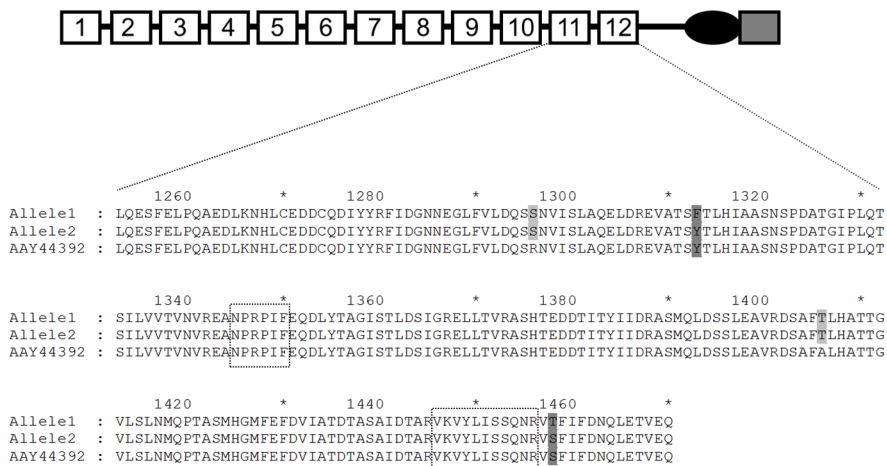


Figura 27. Secuencia aminoacídica de la región TBR de los alelos C y D del gen *cdh*. La parte superior de la imagen esquematiza la caderina de 12 dominios proteicos. El ovalo negro indica la zona transmembrana y el cuadro gris el dominio citoplasmático. En la parte inferior se visualiza la secuencia aminoacídica de la región TBR de los alelos C y D (deducida de la secuenciación) así como la del alelo AAY44392 depositado en GenBank. Las sombras gris claro indican polimorfismos entre el alelo AAY44392 y los alelos 1 y 2, mientras que las sombras gris oscuro indican polimorfismo entre el alelo 1 y los otros dos. Los cuadros enmarcan los motivos propuestos para la unión de la caderina a las proteínas Cry (Griko *et al.*, 2007).

4.2 INTERACCIÓN DE LAS TOXINAS Cry CON PROTEÍNAS DEL EPITELIO INTESTINAL DE *O. nubilalis*

4.2.1 Estudio de la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F a BBMV de *O. nubilalis*

El estudio de la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F al epitelio intestinal de *O. nubilalis* se llevó a cabo utilizando un método diferente respecto a los clásicos ensayos de unión en solución empleados por Denolf *et al.* (1993) y Hua *et al.* (2001) en la caracterización del modelo de receptores de las proteínas Cry1 en las BBMV de *O. nubilalis*. En estos ensayos, las vesículas de membrana se incuban con dos toxinas Cry a la vez (una de las cuales marcada) para evaluar su competición. En nuestros ensayos se realizaron incubaciones secuenciales con las proteínas Cry individuales para establecer si la incubación previa podía inhibir la unión de la toxina biotinilada utilizada en la segunda incubación.

En los ensayos en los cuales utilizamos la proteína Cry1F biotinilada pudimos apreciar un efecto de bloqueo producido tanto por la incubación previa de las BBMV con la toxina sin marcar homóloga (Cry1F) como con la toxina heteróloga Cry1Ab (Figura 28). Las concentraciones más bajas de bloqueante utilizadas en los ensayos (25 veces más que la proteína biotinilada para el bloqueante homólogo Cry1F y 100 veces más para la Cry1Ab) resultaron en una disminución de la señal de la unión de la proteína Cry1F a las BBMV de *O. nubilalis*.

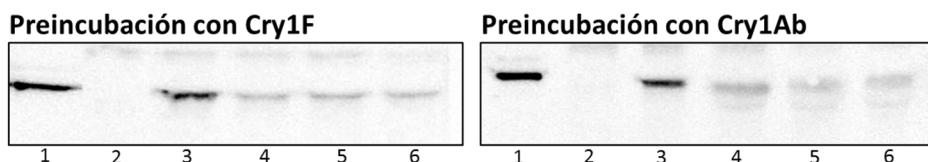


Figura 28. Bloqueo homólogo y heterólogo de la unión de la proteína Cry1F biotinilada a las BBMV de *O. nubilalis*. Inmunodetección de la Cry1F biotinilada tras ensayo de unión a BBMV. Preincubación con Cry1F: 1) Cry1F biotinilada; 2) Control negativo; 3) Control positivo; 4) Cry1F 25x, 5) Cry1F 50x, 6) Cry1F 100x. Preincubación con Cry1Ab: 1) Cry1F biotinilada; 2) Control negativo; 3) Control positivo; 4) Cry1Ab 100x, 5) Cry1Ab 200x, 6) Cry1Ab 300x.

Contrariamente a los resultados obtenidos en la unión de la proteína Cry1F, los ensayos realizados con la proteína Cry1Ab biotinilada mostraron que la unión de esta proteína no se veía afectada en ningún caso por las preincubaciones. Bajo nuestras condiciones experimentales, tanto utilizando el bloqueante homólogo Cry1Ab como el heterólogo Cry1F, la intensidad de la señal de la proteína Cry1Ab

biotinilada unida a las BBMV de *O. nubilalis* no disminuyó en ningún caso al aumentar de las concentraciones de bloqueante (Figura 29). Repetimos este ensayo utilizando BBMV de *S. frugiperda*, otro lepidóptero susceptible como *O. nubilalis* tanto a la proteína Cry1Ab como a la proteína Cry1F. En esta especie, la preincubación de las BBMV con cantidades crecientes de bloqueante homólogo Cry1Ab provocó una disminución de la señal producida por la unión de la proteína Cry1Ab biotinilada (Figura 29). Por el contrario, la preincubación de las BBMV con la proteína Cry1F no afectó a la unión de la proteína Cry1Ab biotinilada.

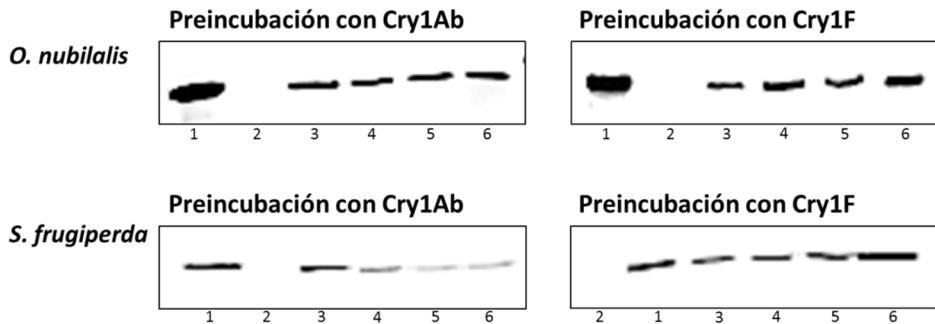


Figura 29. Bloqueo homólogo y heterólogo de la unión de la proteína Cry1Ab biotinilada a BBMV de *O. nubilalis* y *S. frugiperda*. Inmunodetección de la Cry1Ab biotinilada tras ensayo de unión a BBMV. Preincubación con Cry1Ab: 1) Cry1Ab biotinilada; 2) Control negativo; 3) Control positivo; 4) Cry1Ab 25x, 5) Cry1Ab 50x, 6) Cry1Ab 100x. Preincubación con Cry1F: 1) Cry1Ab biotinilada; 2) Control negativo; 3) Control positivo; 4) Cry1F 100x, 5) Cry1F 200x, 6) Cry1F 300x.

Finalmente, pusimos a punto un ensayo de competición homóloga de la unión de la toxina Cry1Ab en solución para confirmar la especificidad de tal unión. Incubamos las BBMV de *O. nubilalis* a la vez con la toxina Cry1Ab biotinilada y con cantidades crecientes de toxina Cry1Ab sin marcar. Pudimos observar un desplazamiento de la unión de la proteína Cry1Ab biotinilada al aumentar de la concentración de competidor. Este resultado indica la especificidad de la unión de la proteína Cry1Ab a las proteínas del epitelio intestinal de *O. nubilalis* (Figura 30).

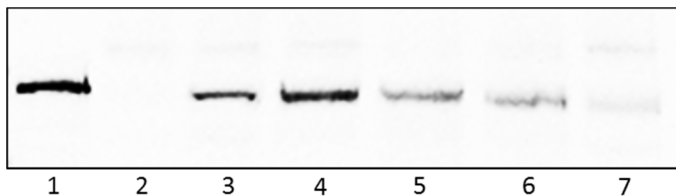


Figura 30. Ensayo de competencia homóloga de la proteína Cry1Ab biotinilada a las BBMV de *O. nubilalis*. Inmunodetección de la toxina Cry1Ab biotinilada tras ensayo de unión a BBMV incubadas con diferentes concentraciones de competidor (Cry1Ab sin marcar). 1) Cry1Ab biotinilada; 2) Control negativo; 3) Control positivo; 4) Competidor 25x; 5) Competidor 50x; 6) Competidor 100x; 7) Competidor 200x.

Evaluamos también la participación de proteínas glicosiladas en la unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1F al epitelio intestinal de *O. nubilalis*. Con este objetivo, antes de la incubación de las BBMVs con las toxinas, bien incubamos las BBMVs con diferentes lectinas (Concanavalina A, WGA o SBA) o bien incubamos las proteínas Cry biotiniladas con diferentes azúcares (Mannosa, GalNac, GluNac o ácido siálico). Trascurrido el tiempo de la incubación con el agente bloqueante, este no se eliminaba de la solución y quedaba presente durante el ensayo de unión. Pudimos observar que la unión de la proteína Cry1Ab no resultó afectada ni por las preincubaciones de la toxina con los azúcares ni por las preincubaciones de las BBMVs con las lectinas (Figura 31). La unión de la proteína Cry1F biotinilada tampoco resultó estar afectada por la preincubación de las BBMVs con diferentes lectinas pero sí por la preincubación de la proteína marcada con el ácido siálico, que provocó una aparente reducción de la señal procedente de la unión (Figura 31).

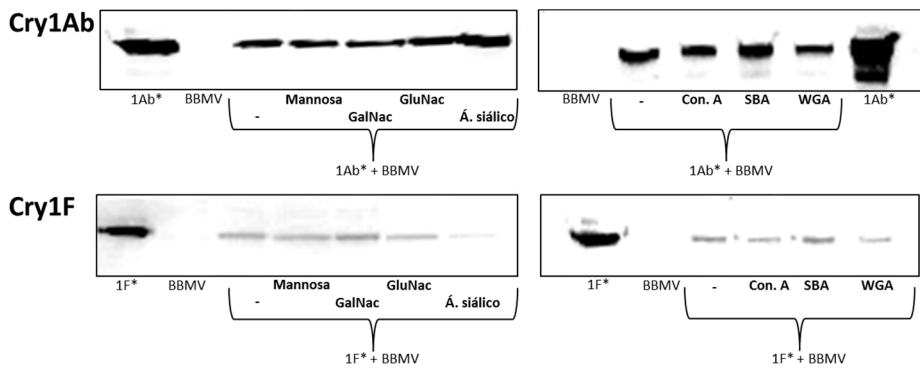


Figura 31. Efecto del bloqueo de azúcares y lectinas sobre la unión de las proteínas Cry a las BBMVs de *O. nubilalis*. Inmunodetección de la Cry1Ab o de la Cry1F biotinilada (*) tras ensayo de unión a BBMVs. Con. A: concanavalina A.

La participación de la caderina en la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F a las BBMVs de *O. nubilalis*, se evaluó mediante preincubación de las BBMVs con un anticuerpo específico para esta molécula. Los resultados mostraron que el bloqueo de la caderina producido por el anticuerpo específico no varió en ningún caso la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F (Figura 32).

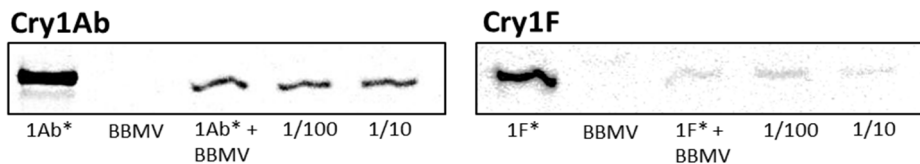


Figura 32. Efecto del bloqueo de un anticuerpo anticaderina sobre la unión de las proteínas Cry a las BBMVs de *O. nubilalis*. Inmunodetección de la Cry1Ab o de la Cry1F biotinilada tras ensayo de unión a BBMVs preincubadas con anticuerpo específico anticaderina. 1Ab*: Cry1Ab biotinilada, 1F*: Cry1F biotinilada, 1/100 y 1/10: concentración de anticuerpo.

4.2.2 Identificación de las proteínas del epitelio intestinal de *O. nubilalis* que unen a las toxinas Cry1Ab y Cry1F

La inmunodetección de las toxinas Cry1Ab y Cry1F unidas a proteínas de las BBMV inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa mostró que ambas toxinas unían a dos bandas de un peso molecular aproximativo de 75 y 150 kDa (Figura 33A). Además, la proteína Cry1Ab unía a otra banda de un tamaño de alrededor de 250 kDa resultando en una señal más débil respecto a las precedentes. Cabe señalar esta banda de alto peso molecular no era detectada de forma constante: aparentemente su detección dependía del tiempo de almacenamiento de las BBMV (datos no mostrados) y de la eficiencia de la transferencia.

La inmunodetección de la caderina en las proteínas de las BBMV de *O. nubilalis* reveló principalmente tres bandas (Figura 33B): dos de alrededor de 250 kDa, que podrían representar la proteína completa con diferentes grados de glicosilación (y que podrían corresponder a la banda detectada por la unión de la proteína Cry1Ab), y otra banda (quizás un doblete) de unos 120 kDa que podría corresponder a una forma fragmentada de la caderina después de la pérdida de repeticiones en el extremo N-terminal según sugirieron Siqueira *et al.* (2006). También se inmunodetectó una banda débil de alrededor de 85 kDa, aunque no de forma constante.

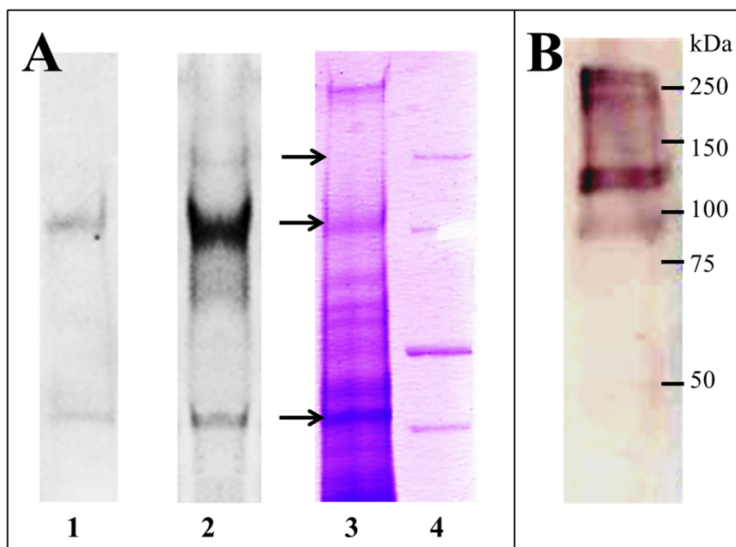


Figura 33. Proteínas de las BBMV de *O. nubilalis* a las que se unen las toxinas Cry1Ab, Cry1F y el anticuerpo anticaderina. A) Inmunodetección de la unión de las toxinas Cry. Carrera 1) Cry1F; 2) Cry1Ab; 3) Tinción con azul de Coomassie de las proteínas de las BBMV. Las flechas indican las bandas seleccionadas para el análisis por LC/MS/MS. 4) Marcador de peso molecular (250, 150 y 75 kDa). B) Inmunodetección de caderina.

Las tres bandas que unían a la proteínas Cry1Ab y/o Cry1F (tamaños aproximados de 75 kDa, 150 kDa y 250 kDa, Figura 33A) se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS) en el laboratorio de proteómica del Centro Príncipe Felipe (Valencia). Los péptidos obtenidos se identificaron mediante la base de datos NCBI (restricción taxonómica a insectos) usando el algoritmo de búsqueda Mascot (MatrixScience, UK) (Tabla 16).

Los péptidos identificados en la banda de alrededor de 250 kDa no dieron homología con ninguna proteína de insecto presente en las bases de datos.

Tabla 16. Identificación de los péptidos obtenidos por LC/MS/MS

NO. Acceso NCBI	Descripción	Especie	Puntuación Mascot	Masa (kDa)	Péptidos identificados
Banda de 150 kDa (repetición 1)					
gi 118505044	APN1	<i>O. nubilalis</i>	1297	82*	32
gi 118505048	APN3a	<i>O. nubilalis</i>	820	87*	30
gi 118505046	APN2	<i>O. nubilalis</i>	224	61*	4
gi 5852166	V-ATPasa, subunidad A	<i>M. sexta</i>	113	97	3
gi 2498144	Apolipoforina	<i>M. sexta</i>	103	370	4
gi 7443844	Chaperonina groEL-like	<i>S. oryzae</i>	68	57	1
gi 91076598	V-ATPasa	<i>T. castaneum</i>	52	96	2
Banda de 150 kDa (repetición 2)					
gi 345548863	APN1	<i>O. nubilalis</i>	1460	114	39
gi 345548862	APN3b	<i>O. nubilalis</i>	1037	116	26
gi 345548871	APN3a	<i>O. nubilalis</i>	821	116	24
gi 345548872	APN3c	<i>O. nubilalis</i>	466	123	14
gi 357611408	V-ATPasa	<i>D. plexippus</i>	174	95	4
gi 2498144	Apolipoforina	<i>M. sexta</i>	151	370	4
gi 357612448	Apolipoforina	<i>D. plexippus</i>	116	782	3
gi 256674274	APN8	<i>O. nubilalis</i>	109	104	4
gi 336319051	Dipeptidil-peptidasa	<i>B. betularia</i>	80	10*	2

NO. Acceso NCBI	Descripción	Especie	Puntuación Mascot	Masa (kDa)	Péptidos identificados
Banda de 75 kDa					
gi 258547214	APN4	<i>O. nubilalis</i>	727	109	15
gi 294509206	APN1	<i>O. furnacalis</i>	616	114	14
gi 124013459	HSC70	<i>P. interpunctella</i>	566	73	13
gi 27260894	HSC70	<i>S. frugiperda</i>	563	73	13
gi 188532068	HSC70	<i>L. sticticalis</i>	510	51*	12
gi 3455488671	APN3a	<i>O. nubilalis</i>	345	116	8
gi 357608825	Larva gigante letal	<i>D. plexippus</i>	305	109	6
gi 253750847	APN3b	<i>O. nubilalis</i>	274	117	6
gi 126742098	Proteína almacenamiento	<i>O. fuscidentalis</i>	244	83	9
gi 91076598	V-ATPasa	<i>T. castaneum</i>	115	96	2
gi 327420510	Fosfatasa alcalina	<i>M. configurata</i>	107	22*	2
gi 110743535	Arilforina	<i>C. suppressalis</i>	89	84	4
gi 159491	Precursor arilforina	<i>M. sexta</i>	88	84	3
gi 357611405	Proteína hipotética KGM_03534	<i>D. plexippus</i>	76	61	2
gi 5852166	V-ATPasa, subunidad A	<i>M. sexta</i>	72	97	2
gi 118505046	APN2	<i>O. nubilalis</i>	68	61*	1
gi 194853139	GG24690	<i>D. erecta</i>	65	128	2

*La masa molecular corresponde a secuencias aminoácidas parciales depositadas en GenBank

La banda de alrededor de 150 kDa se analizó dos veces. La primera cortando una sección de gel cuya área cubría estrictamente el tamaño de 150 kDa y la segunda hasta un tamaño de alrededor de 130 kDa. Los resultados de los dos análisis fueron similares (Tabla 16): en ambos casos encontramos una mezcla de proteínas y las asignaciones con mayor puntuación Mascot (las asignaciones más probables) correspondieron a componentes de la familia proteica de las APN de *O.*

nubilalis (Figura 34). En el primer ensayo de identificación de las proteínas de la banda de 150 kDa a la asignación de mayor puntuación fue la APN1 (1297) seguida por la APN3a (820) y la APN2 (224). Se encontró homología, con menor puntuación, con las ATPasas vacuolares de *M. sexta* (113) y de *Tribolium castaneum* (52), con el precursor de la apolipoporfina de *M. sexta* (103) y con una chaperonina de *Sitophilus oryzae* (68).

1	MARSVLLLAGVALLQVCTFNPLPLLEEEAEWFKS-----RELNDASFRLLPTTMPMHYELSLTPYFEDEE-RPFTFDGTVAIYTSATEENSVIEIVHCNDL	98
2	-----MLLLLVLLIGSAVASPVSQEESRTLNEQLA-----AQYNLPRITIPTFYDVTFLNPSYDP-----NFGSVSIRIVPNIIT-TNIVLHAMEM	83
3a	MATLKLILAAACAAQAFPPQPPRYNTIIFGDKLEGEAFENIDDFDGNLTQLSRDD--NPYRLPTTRPEHYNLIMWVEIPAN-----IPSGVEIQLYATQENNEIVIQANGL	110
3b	MATLNFILIAAIVCAAQAFPPQPPRYNTIIFGDKLEGEAFENIDDFDGNLTQLSRDD--NPYRLPTTRPEHYNLIMWVEIPAN-----IPSGVEIQLYATQENNEIVIQANGL	112
3c	MATLNLILAAVCAITAAQAFPPQPPRYNTIIFGDKLEGEAFENIDDFDGNLTQLSRDD--NPYRLPTTRPEHYNLIMWVEIPAN-----IPSGVEIQLYATQENNEIVIQANGL	112
8	-----MRLVIVAAKLLICNSRSDP-----NYRLMTTKPKSKYASIEIMPFDFSSDERAFTFMGSDVTITFTSDEP-IMQIKLHSQDL	75
1	THSLVTEHTDARGVQQIAAPQTECEAPQSLRIATIEPLQVQ-----QEVIRRSPTGNLQSMNMGFYRSVWRDSTTT---RMMATQPPQYQARQAPCYDEDFKATFDIM	207
2	EILNIEVFSVLTNT--ADIQFQHLFATDDTHFLRIFINELMFLFN-----QLYVNIIEYRQYASNMGGIYVSTYEQAGLQVFN--LQTSQQTFFARRAFPCYDEPALKAFIFPTTI	190
3a	NITSVWLKLGDE-----IHVTVLQPEYHFLRVALSNGVLYQSATNRVLYSLNIEFLAPLRTDMYGIENYWRNNAASDENVWMASTQFQATSARVAFPCYDEPSPKATFNITL	220
3b	NINSVLKLGDE-----IAQTFLQPEYHFLRVALSNGVLYQSATNRVLYSLNIEFLAPLRTDMYGIENYWRNNAASDENVWMASTQFQATSARVAFPCYDEPSPKATFNITV	221
3c	NITSMLKLEDE-----IQTFLVQPEYHFLRVALSNGVLYQSATNRVLYSLNIEFLAPLRTDMYGIENYWRNNAASDENVWMASTQFQATSARVAFPCYDEPSPKATFNITV	217
8	FTSSONITSNAAAG-AVPLMETNALEPDSAYTFPHINLQGLAQG-----VVYTRILYEGPREDLITGFRYRNYIEKGVK--WLAGTGMPEHARKVPCYDEPDLKAVFLTI	183
1	NREPDFSPTISNMPIKTETM--TGRISETFTYPTITSTYLLAIVSHYKVEYN--NDEDRPFDIYARDNAN--GTGAWSLIEGMKLEAMENYDTPYVYMAEKINMKAQAIID	318
2	YAPPGYTVRSNMLRNDINPKELIAGWVKHEFQDTLRCSTYLLAVLVSSFEYISNENDPIEYVFRVYSRPQTQS--NSFALDFQKMKMILELPAVFP---KLDKAAVDF	301
3a	RRPVFKSQTGMRLQNIITSP--IEGFVDVDFITPIQSTYLLAIVAEYETLEKLNIEITGDDEYEVIRAPGAIQSQQAFYEVQGLLEAMNSHTMDFVSVHPHKMGTQAAID	335
3b	RRPFGFNSQTGMRLQNETSN--IAGYEDVFTTIPIMPYLLAIVAEYKSRVYV--NDGTVYEVIRAPGAIIDTQDQVALIEIQKLLAEMSDHLDLDFVHPYLLKQTQAVDF	334
3c	RRPFTFSQTGMRLQNETST--LQGYEDVFTTIPVVSYLLAIVAEYETREYV-DVGNLLYEVIRAPGAIIDTQDQVALIEIQKLLAEMSDHLDLDFVHPYLLKQTQAVDF	331
8	MRPASYKPLNTKIAATDNL--SNGVYEDFPHTPRMSTYLVAVLVELEAQYVS--SNNSMFGVFPARPEATN--QTEYAFDQKRVVADALGDYFVNVYSTNNQLKDLHIALPN	294
1	FRAGMENGLLTYREALILYLDPLNSNHFYKQREANIVSHEIAHMFQNLVTCMWNGLMINEGFARFYQYFLTGSVAELGVERHFMWQYISALSDVSDVSBAHALDNV-FVNFPT	434
2	FRAGMENWGLVYREVALLVLEHTVTTTQTLQNGIRIICHEMNMHFGNEGVQYSWTYWLNEGFANFENFATDLVNFHMRMDDQYVAIQV-VFQSDSLVSNPMTYV--PTFS	415
3a	FRAGMENWGLLTYREALILYLDPLNSNHFYKQREANIVSHEIAHMFQNLVTCMWNGLMINEGFARFYQYFLTGSVAELGVERHFMWQYISALSDVSDVSBAHALDNV-FVNFPT	434
3b	FRAGMENWGLLTYREALILYLDENHTNSYFQQLIAYILSHEIAHMFQNLVTCMWNGLMINEGFARFYQYFLTGSVAELGVERHFMWQYISALSDVSDVSBAHALDNV-FVNFPT	447
3c	FRAGMENWGLLTYREALILYLDENHTNSYFQQLIAYILSHEIAHMFQNLVTCMWNGLMINEGFARFYQYFLTGSVAELGVERHFMWQYISALSDVSDVSBAHALDNV-FVNFPT	447
8	FRAGMENWGLVYREALLLVYEPSEPFYKYRVAVQVAHEITHMWFQNLVTCMWNGLMINEGFARFYQYFLTGSVAELGVERHFMWQYISALSDVSDVSBAHALDNV-FVNFPT	410
1	TWNVFHTITYARGAICLRMTQYLLGQYVYKGLSYLKERAFDVAEPHFLFNALDAARADGALAAQY-GITIDYFRFTWSEKAGHPMLSDVITDRTGTMQVQARWERTGSSAF	550
2	QIISTFNNAVAYQKSGVIRNMQYHLETFEIRFQGLQYVSNMRSKRAQPSDLFANLQEDVADNSNHSIPEW---IATIMDRWNTQGGPVLVTFGSAPTANSLTIAQERFLTRLSLTS	528
3a	SVSMFSTIYSYKNGAIIIRQTEHLMGDFVHREGLRFLRVERSFETALPIHLFQALQDAVAEAGAIAEYGEFFNIIDYKVTWTEQGGHVLNVAIEDHQTGLMTYQRFFRNISGVSTP	568
3b	QIARMFSTIYSYKNGAIIIRQTEHLMGDFVHREGLRFLRVERSFETALPIHLFQALQDAVAEAGAIAEYGEFFNIIDYKVTWTEQGGHVLNVAIEDHQTGLMTYQRFFRNISGVSTP	568
3c	EVRSMFSTIYSYKNGAIIIRQTEHLMGDFVHREGLRFLRVERSFETALPIHLFQALQDAVAEAGAIAEYGEFFNIIDYKVTWTEQGGHVLNVAIEDHQTGLMTYQRFFRNISGVSTP	564
8	EISEHGTITTYKAGSVIRMMHGLIDEFAPRIGLNSVLTINQOAGYEMMYSALEKRGVNTNSLALP--GHTIGDMSWSIQAGHPVLVDQVNYEASSVLTIGRRYIN--GHTS	525
1	PGIWDIEITWTRGAGADDDKLPQFLTQSTVIRGTEGL--EWFVFNKQASGFRVNYDDTNWALVQALRN-NPNIIVLNRVQIIDLPLNMRGRAGRVYQVNLNLLSFLQFD	663
2	TRDRHWVWMLSDTDFNDSPOQFIPERTSPFAVADIPGLAQAEWYIVNKQDTQCYRVNYDQVWMAALASVLSN--THELHVLNRAQIIDDFANLRANGVNYALIESRVLVRE	644
3a	TNNVIEITFATASDDPFPNKPSHIIRDQITVINRNSIGD--EWFVFNKQOAGFRVNYDDYSNWLNINLALGPRDNQIHEFNRAQIIVNDVQFARGSLMTYTRAFNLSFLNE	682
3b	TNNVIEITFAMASDDPFDPTKPSHIIRODQITVINRNSIGD--EWFVFNKQOAGFRVNYDDYTNWLVNTRLGRNPNRQIHHVLRNRAQIIVNDVQFARGSLMTYTRAFNLSFLNE	682
3c	TNNVIEITFATASDDPFDPTKPSHIIKDAVSVINRNSIGD--EWFVFNKQOAGFRVNYDDYSNWLNINLALGPRDNRQIHHVLRNRAQIIVNDVQFARGSLMTYTRAFNLSFLNE	678
8	DETYEIPITTYTDDNPNFVMTFAPIMEGKHTFPIHNFQ--DWIIFNLQTEGLRVRYDQSLSLQMIKLKGGLEKHEHYLNRAKIIDNLPFVYADEVDFSTLNDALLYLQSE	639
1	DEYGFVIAAIDGFNPLRLAHADNPKLQKLRDINKELSVAVTGRGLYVEVENETFMGILRMVLMNPLCDNGHEECIATIEKFAEWKAGG-FIPANMRPWYVCTGLRFGDAEDFE	779
2	EDYIPWAAANAFAYLDVLTGSEVYHLRQRYVLELTAPLYSS--LGFNNTANDFVYAYHRTIIVLNFNCRFGNEHCVETAQEMLESFRTOVLRALADQITTVYCSGLRGGDADNFD	759
3a	TDYTPWAAAVTGFNWRNRLIGSS--YLAELAMIAKRWATVMN--QPTYPFRDSEFMSYLRQYLAFFMNCNINQACREAAVQFQALRNDNNEVYVDSRNWVYCNALRQSGEEDFE	797
3b	TDYTPWAAAVTGFNWRNRLIGSS--YLDVDEMLARWATVMN--QPTYPFRDSEFMSYLRQYLAFFMNCNINQACREAAVQFQALRNDNNEVYVDSRNWVYCNALRQSGEEDFE	797
3c	TDYTPWAAAVTGFNWRNRLIGSS--YLSGLDEMLARWATVMN--QPTYPFRDSEFMSYLRQYLAFFMNCNINQACREAAVQFQALRNDNNEVYVDSRNWVYCNALRQSGEEDFE	797
8	TFDNPVAAIRGLNKLRSRLVGTDTVDADIIDHLLHHTIA--YLGFEERESDDFETTRNRMQVLELACKLVHTDCVHFAPKFRNFDVGEVIPSRLRPAVCTGLRYGTDADFE	755
1	FWNRYLQDLADLQGLVWLNQAGTDRDEASLRKFLDIAVSQNGIVRQDQPTTALNASVSKNEYNTMRAFWALKDNVQTEBALG-----GIATPLSIVYRLLNEQDAEVGT	887
2	FLMDYRQLDSTSSQGSILLNAGCTCSNADRKQPNVQMINVETSVQREDRHTLIVSTINASPENMEALDFVFNHFLIPQRVQG-----LGSNTINLNLRSRHTLQAHSDNFQD	870
3a	FLWRFENHNIVYTEKILLVQLGCTPHEASLTKLLDIAVTFNPFVIRQDQYTTAFSTAVNGNEGNTQIVFNVIQTNLQVAAAFQ--TILNFINATYPLSIVYRLLNEQDAEVGT	911
3b	FLWRFENHNIVYTEKILLVQLGCTPHEASLTKLLDIAIQPNFIRQDQYTTAFSTAVNGNEGNTQIVLRYQRNITAVAVAFAPASALTSIDETPTTISYIPLRNLNEIKEFE	914
3c	FLWRFENHNIVYTEKILLVQLGCTPHEASLTKLLDIAVEDNYIRSQDQYTTAVAVNGNEGNTQIVLRYQRNITAVAVANAFQ--TILTFVNVATYPLSIVYRLLNEQDAEVGT	907
8	FMWHRMSTNVANEARLIGEVLCCTDEASLKKFLVSLMEENSIMSQDLTVPLSGVVG--NHSVHIVLDLGNKNTFLMSIYPP-----SMDTVFNAVAGALRTEAEINFEFS	862
1	WLDENQDSIGTAVNTGVNGIAS--SRNNLAWGARMPVEYVFDNGVYVEIEDPTQEVVTEESVTVTPELDEVTTEVD-----	968
2	LFNRHQIFPTAGELASIGAIENIAASLWSAEYLDTVESLWLEN-----	915
3a	WMAATQDILNGSYNSYNSAES--SRDLSQWAVQGDLENYLETG--DETYEASSTPVTVDAPVTEVTPQPLEEPTPEL-----	988
3b	WVVASRDELSTNSYNSYNSAES--TRQSLKWAANQSDMENVYLTAG--DDYESTSAPVVIIEPTVTPAPLSEPNPNDL-----	991
3c	WVWAMVQPTSYSSYNSYNSAES--TRQSLKWAANQSDYTYLNEG--DETYESTSQVVIIEPTVTPAPLSEPNPNDL-----	1020
8	WLSNCTKCG--DKDGALATLAS--GRANAMWVESHKTELLNAFKGH-----	904
1	-----DESDSANTAAISFTPLIRVSNILS	994
2	-----YDSSALITSSYFVIFISVFIAPNH--	940
3a	-----SEDSANTAFLLSVLAIJAVAAANFAL	1014
3b	-----SEDSANTALLSVVILAAVAANFAL	1017
3c	VTVDPIITSEPIFTDAPTPELDEVTTEVD-----	1074
8	-----AVLPPSSLALIVLCLAVLRLN--	925

Figura 34. Péptidos pertenecientes a isoformas de APN de *O. nubilalis* identificados en la banda de 130-150 kDa. Los péptidos identificados por espectrometría de masas se señalan en color. Azul: péptidos identificados en la banda de 150 kDa, rojo: péptidos identificados en la banda de 130-150 kDa, verde: péptidos identificados en ambos análisis.

En la segunda repetición, las asignaciones de mayor puntuación fueron la APN1 (1460), APN3b (1037), APN3a (821) y APN3c (466). Además se identificó

la APN8, con una puntuación mucho más baja (109) respecto a las otras isoformas. Permanecieron las homologías con la ATPasa vacuolar de *Danaus plexippus* (174) y con las apolipoporinas de *M. sexta* (151) y *D. plexippus* (116) y se identificó una dipetidil-peptidasa de *Biston betularia* (80).

En la banda de 75 kDa las asignaciones de mayor puntuación correspondieron nuevamente a dos APN de *O. nubilalis* (Figura 35). La APN4 tenía una puntuación en Mascot de 727, mientras que la APN1 de 616. Además se encontró homología con la APN3a (345), la APN3b (274) y la APN2 (68). Otras proteínas con las cuales se encontró homología fueron las proteínas de choque térmico HSC70 de *P. interpunctella* (566), *S. frugiperda* (563) y *Loxostege sticticalis* (510), la proteína larva gigante letal de *D. plexippus* (305), una proteína de almacenamiento de *Omphisa fuscidentalis* (244), las ATPasas vacuolares de *T. castaneum* (115) y *M. sexta* (72), la fosfatasa alcalina de *Sexilia configurata* (107), las arilforinas de *Chilo suppressalis* (89) y de *M. sexta* (88) y dos proteínas hipotéticas de *D. plexippus* (76) y *Drosophila erecta* (65).

1	: MARSVLLLGSVAVSFSQESRLLTNEQLA-----RELNDAFRLPTTTPRHYELSLTPYFEDERPFPTDGTVAIYTSATEENVSEIIVHCNDLT	: 99
2	: MLLLLVALLIGSAVASFSQESRLLTNEQLA-----AQYNLPRTEIPTFYDVTFLFNPSYPDN---FNGSVSIRIVPN-ITTNVIVLHAMEME	: 84
3a	: MATLKLLILAAACLAQAQAFQDPRPYRNTIFADEKLEGEAFENIDDFDGMQLSRSD--NPYRLPTTTRPERHNLWVVEIPAN----IPSGEVEIQLYATQENVNVIQANGLN	: 111
3b	: MATLPIFLLAAVCLAQAQAFQDPRPYRNTIFADEKLEGEAFENIDDFDGMQLSRSDDETANPIRLTTPKPERHNLWVVEIPEN----VFSGEVEIQLYATQENVNVIHQYLN	: 113
4	: MGSIMLLPILFLFAGVAAYPNEMRSDLFPCYSTNLD-----DPKYRLTDSVQPRDVIYVHLDVHVVEAR---FDGFIQLDVEIESGMQIVLHQKVVVS	: 92
1	: IHSLVFVHTDAGVGVQIARAQFTECEAPQSFLRIATIEPLVQGOQVYIRLSFRTGNLQSNMG--FYRSHYRSDTST---RWMATTFQFGYARQAFPCYDEPGKATDITMWRPE	: 211
2	: IINIEFVSVALT---TADIFQTHFLATDDTHKFLRITICHEMLMNLQYIVNIEYRQVYASNMG--IYVSTYEQALG--TVNLVTSGLQPTFARARAFPCYDEPAKAIIFRTTIYAPP	: 194
3a	: ITSVVLKLGDE-IPIHTVLPQYFHLRVALSNVGLVQYATNR-VLVSINLEIFIAPLRTDMYG--IYENWYNNASDEWVSWASQFQATGARAFPCYDEPSKATFNILTRPVP	: 224
3b	: INSVLKLGDDE-IAQTFSLQPEYDFLRVSLTNGVLEYSATNR-ILYSLTIIDFNAPLRTDMAG--LYQWFRNTAND-SEWMSHATFOATTARAFPCYDEPSKATFNILTRPVP	: 225
4	: IQTVNVLDSAGRPVNLQPNPFSTDDHFEILLINLADPISAGN---YTAISYGLKIHENQYDRGFQYVYFNGEK---RYATTFQPPFVARTTFPCDEPQKSRFVLSLTRDS	: 203
1	: DFPSTISNMPIKTTENT---TDGRISETFYVTPITSTYLLAFIVSHYDKVETNNDND--RPFDIYARDNAN---GTGANSLEIGMKLLEAMENVTDPYPTMAEKINMK---QAIPDPFN	: 320
2	: GYPTVRSNLRNDNPKFIAGWVKHEFDQLDMSTYLLAYLVSSFEYISNENDPIYEVPPFRVSRPQTQ---SNSFALDFGQKMLALENVIELPYAFP-----KLDKAAVDFPA	: 303
3a	: GFKSWTGMRLQNNITSP---IEGVDDVFFITPISQTYLLAIIIVAEYETLEKLINEITGDLEYEVIARPAIQSGQAQYAFVEVGGQLLAEMSNHTAMFFSVHPHKMT---QAIPDPFS	: 337
3b	: GKNWVGMRLQNTNSN---IAGVEEDVFFITPIMPTYLLALIVAEYKSRVFNQDTG--LVYEVIAARNADITNQGQYALEIQXLLASMSDHTALDFYDVVHLYKMT---QGAVPDRP	: 336
4	: SLPQSYSNMPIGETVET---SPGRIETFLPTPIVSVYLVAFTVSDVATNLTST--RPFQIVSRPGVT---SQHVYAGGLDITNELDLYGIEYYEMGQGVPMNDHLAIDPFP	: 314
1	: AGAMENGLLTYREALIYLDPLNSNHFYKQREANIVSHEIAHMWFGNLTVCANWGNLWLNQGFARFYQYFLTGSVAPELQYERFRFVPEQYIISALSDVSDSAHALTNDP-VYNP	: 436
2	: AGAMENGLVIYREALVLTGVTITTLQNLGIRIICHENHMWFGNVEVGPYSWTYTLWLNQGFANFFENFADLVNPHRMDQYVIAVQN-VFQSDAVLNVNPMYVYV--FTPSQI	: 417
3a	: AGAMENGLLTYREALIYLDYDENTHSYFQKLIAYIISHEIAHMWFGNLTVCANWGVFLWLNQGFARFYQYFLTDWVETMGLSTRFNEQVHLSLSDSNNPQPTLNPV-IGSPSSV	: 453
3b	: AGAMENGLLTYREALIYLDYDENTHSYFQKLIAYIISHEIAHMWFGNLTVCANWGVFLWLNQGFARFYQYFLTDWVETMGLSTRFNEQVHLSLSDSNNPQPTLNPV-IGSPSSV	: 453
4	: SGAMENGLVIYREALIYLDYDENTHMKIKPIATIMAEHLARWFKGNLTVCFWNSNLMNESFASFFFYFAHYADPSELDLDDQYIIVDYSALSDSGSGAFTPHWTVVYVNP--SI	: 430
1	: WNHFTIYARGACILRMTQYLGGQETVYKGLRSYKLESAFVVAEPFHLFNALDAAREDDGALAAVGG--ITIDRYFRTWSEKAGHPMLSVTIDRQGTQWVQARWERTTQSSAFPQ	: 552
2	: ISTFNVAAYKQSSQVIRMQHYLTFEIFFQGLQVYVSNMGRKAAQSDLEFANLQVLDLDS---NHSIPWPIATIMORWTKQGFPLTFVRSAPFANSLTIQVRELRDLSLSTSD	: 530
3a	: SGEFSTIYKNGGAAIIRGTHLGMFVHREGLRVLERSFETALPHLQALQDAEVAAGALAEVGEFNIIDYKWTWQGGHPVNLVEIDRGTITLYQRFRINLSYSTPTT	: 570
3b	: RAMEFSTIYKNGGAAIIRGTHLGLRVRHQRGLRYLVDRSFTNAQIHLFEALQTEAVAGALAQYGDGFNVIDYKWTWQGGHPVNLVEIDRGTITLYQRFRINLSYSTATT	: 570
4	: WSHFSTIYKARAEVLRMEHFMGARFRFQKRLMIRYRENAAYGLQTPEDLYRALKKAASVDEMAFRFRDFPDADLQGLLNDNVNWFARFPCYDEPQKSRFVLSLTRDS--TPVAG	: 545
1	: IWDIPIITWTEGAADFDLKPQSFLT---AQSIVIERGTEGLEWVFNPKQASGFYRVNDDTNMALIVQALRN--NPNVIHEFNVRQIIDLFLNMGRAGRVPQQVNLNLSFLQFDD	: 664
2	: RHWVFNLSDFNDNFDPNQSGWIPSPFAVAIDIPGLQAEVIVNKKQQTGYRVNVDYQNWALASVNLST--HELILHVLNRAQIIDDAFNLARNGRVNNVALEISRYLVREE	: 645
3a	: NWIVPITFAMASDFDNFKTPSHIR---DGIITVNRNSIGDEWVFNPKQQTGYRVNVDYQNWALINLRGP--DRNQIHEFNRAQIIVNDVQFARSGLMTYVRAFNLISFLENET	: 683
3b	: NWIVPITFAMASDFDNFKTPSHIR---DGIITVNRNSIGDEWVFNPKQQTGYRVNVDYQNWALINLRGP--NRQIHEFNRAQIIVNDVQFARSGLMTYVRAFNLISFLENET	: 683
4	: LWDIPIITWTEHRELFNSTRSPFISL---TASTIION-TGPHFVWLNIAQSGLRVYVNDHHEWMLASVLRNANRTRTVNHLNRAQIIVNDVQFARSGLMTYVRAFNLISFLEIET	: 658
1	: EYGPWIAIDGFNFVLRRLAHADAPNLQKLRIDINKLEGSVAVTGRIGVEVENETFMDGILRMVLMNPLCDNGHHECIATGIEKFAEMKAGG--IFPNMRPWYTCGLFGDAEDEF	: 779
2	: DYIPWAAANAAPYADVLLVLTG--SEVHLFQRYVLELAPLAYSLSLGNNTANDEFVYARTYHRTIVLNFNCRFGNEHCVEYTAQMLEFSFRTQV-RLAADIQTYVCSGLGGADANFD	: 759
3a	: EYTPWAAITGFNIRNRLIG--SSVLAELAMIAKAWTTVM--QPTYPRDESFMSTRYLYLAFPMCNLNLQTCREAAVQSGFALRYNDT--EVPVDSRWNYCNALRQSEEDFP	: 797
3b	: DYTPWAAITGFNIRNRLIG--SSVLAELAMIAKAWTTVM--QPTYPRDESFMSTRYLYLAFPMCNLNLQTCREAAVQSGFALRYNDT--EVPVDSRWNYCNALRQSEEDFP	: 797
4	: DYYWNGAITQLEWIKKMEHILPARGFQKRLMIRYRENAAYGLQTPEDLYRALKKAASVDEMAFRFRDFPDADLQGLLNDNVNWFARFPCYDEPQKSRFVLSLTRDS--TPVAG	: 774
1	: FFWNRVYQDLAGEQIVMLQNAQCTREASLRFLDAIVSQQIVRQLQDFTALNSAVSKNEYNTMRAFAMKLDNVNQVTEALG-----GIATPLSYIVSRLNEQDMAEVQT	: 887
2	: FLMDYKLSDSSEQLNLALQCTSNARRRQPMQVYINETSQVRRQDRHTLIVSTINASPEMEEALFVNFHLLQPVVQ-----LSQTTNMLNLSRLTQAHSDKVVQ	: 870
3a	: FLMEFENHNVYKXVLLQVQLCTPHEASLKLDDAVTVMFVRRQDYTFPSTAVNKEBNTQIVFYVILQNLVQVAAAG--TILNIPMAYSTLVIKASLSTQEDINFQA	: 911
3b	: FLMEFENHNVYKXVLLQVQLCTPHEASLKLDDAIQPNFIIPQDYTFPSTAVNKEBNTQIVLYVMQRNITAVAVAFAPASALITSEDTPTISVYIPLRNLBLEIKEFEE	: 914
4	: FLNLYETSSENTAMVMVLRALACTKDTASLNQVLSQNLN-DKIRFHDRTNFAAYALQGNVENLPTVLDLFLYNNFAAIRBAHG-----NQDLIVNINAGVFLNYEHIYVFTQ	: 884
1	: WLDENQDSIGTAYNTQVNGIAS--SRNLLAWSARMPVEYVFDNGVYVEIEDPTQEVVTEESVTVTPPELLDIYVTEVDDSDSANAIALSIFTLIRVSNILNS--	: 994
2	: LFNRHQVIFPAGELASIGAIENIAASLRYDITVYESVWLVEN-----YDTSASITSSVFIYVSPVIAFNH--	: 940
3a	: WANATDRELQNGVSNISYNSAES--SRDLSQWAVEVQDGENYLTG--DETYEASSETPVVTDAPVTEQPPLEETPELS--ESDSANTALFVSLVIAVAANAFAL--	: 1014
3b	: WVAASDRELQNGVSNISYNSIES--TRQSLKWAANQSDMENVYTAG--DDVYESSTAPPVVEEPTVYVAPPVLESEVNPDLDS--ESDSANTALFVSLVIAVAANAFAL--	: 1017
4	: WAYANQLALGSFAGNVAVNVNS--AMNLLWNGNSVAEYVDILLAR-----DDVYESSTAPPVVEEPTVYVAPPVLESEVNPDLDS--NSAAVISPALILAAAMATVLLS--	: 951

Figura 35. Péptidos pertenecientes a isoformas de APN de *O. nubilalis* identificados en la banda de 75 kDa. Los péptidos identificados por espectrometría de masas se señalan en rojo.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS AMINOPEPTIDASAS DE *O. nubilalis*

4.3.1 Aislamiento y caracterización de las secuencias codificantes

La clonación de los cDNA correspondientes a los transcritos de las diferentes aminopeptidasas de *O. nubilalis* se inició a partir de secuencias incompletas depositadas en GenBank (para las *OnAPN3a* y *OnAPN4*) o a partir de unas secuencias parciales proporcionadas por el Dr. David Heckel (*OnAPN2*, *OnAPN3b*, *OnAPN8* y *OnPSA*). El primer fragmento correspondiente a *OnAPN1* se obtuvo como producto inespecífico de una amplificación con un cebador diseñado para amplificar el extremo 3' de *OnAPN3b*. La nomenclatura con la cual nos referimos a cada una de las aminopeptidasas se definió después del análisis filogenético, tal y como se explica en el párrafo 4.3.2.

El resultado de la clonación de los ADNc completos fueron siete secuencias de tamaño variable entre 2812 y 3622 nucleótidos. Las secuencias codificantes contenidas en los ADNc tenían un tamaño aproximado de 3 kbp, que traducidas *in silico* daban lugar a unas proteínas con tamaño entre 925 y 1017 aminoácidos (Tabla 17). Las regiones 5' UTR iban de 7 a 109 pb, mientras que las zonas 3' UTR variaban de 167 hasta 748 nucleótidos. La única excepción fue el ADNc correspondiente a *OnPSA*, en el cual se encontró un codón de parada prematuro en la posición 1668, y por tanto la secuencia de la región 3' UTR resultaba compuesta por 1035 pb. Las siete secuencias fueron depositadas en la base de datos de secuencias nucleotídicas GenBank con los siguientes códigos de acceso: *OnAPN1* EU878375, *OnAPN2* EU878376, *OnAPN3a* FJ896130, *OnAPN3b* FJ492806, *OnAPN4* FJ694793, *OnAPN8* FJ647796 y *OnPSA* FJ492807.

Tabla 17. Tamaños de los ADNc correspondientes a las *apn* de *O. nubilalis*

Gen	ADNc ^a	5' UTR ^a	ORF ^a	3'UTR ^a	Proteína ^b	kDa
<i>onapn1</i>	3160	7	2985	168	994	113,3
<i>onapn2</i>	3622	51	2823	748	940	106,6
<i>onapn3a</i>	3461	56	3045	360	1014	115,3
<i>onapn3b</i>	3545	54	3054	437	1017	116,2
<i>onapn4</i>	3054	31	2856	167	951	108,2
<i>onapn8</i>	3129	39	2778	312	925	103,9
<i>onpsa</i>	2812	109	1668	1035	555	63,0

^a Tamaño expresado en pb;

^b Número de aminoácidos que componen las aminopeptidasas traducidas *in silico*.

El análisis *in silico* de los dominios proteicos identificó las secuencias características de las aminopeptidasas en las siete proteínas: el motivo de unión al zinc HEXXH(X₁₈)E y la secuencia GAMEN típica de las gluzincin-aminopeptidasas y esencial para la actividad enzimática (Sjöström *et al.*, 2000) (Figura 36). En todas las secuencias proteicas (excepto en la *OnPSA*) se identificó la secuencia del péptido señal en el extremo N-terminal que sirve para la secreción de las proteínas. De la misma forma, en todas las secuencias con péptido señal se encontró el motivo de anclaje GPI en el extremo N-terminal, característico de las APN de lepidópteros, que permite la unión de las proteínas a la membrana exterior de las células epiteliales (Garczynski y Adang, 1995).

El análisis de *in silico* de los sitios de glicosilación presentes en las secuencias aminoácidas fue llevado a cabo para *OnAPN1*, *OnAPN2*, *OnAPN3a*, *OnAPN3b*, *OnAPN4* y *OnAPN8*, excluyendo *OnPSA*, ya que la falta del péptido señal en su secuencia indicaba que esta proteína muy probablemente no era exportada al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi, o sea los lugares de la célula donde ocurren las modificaciones post-traduccionales de los péptidos, como la glicosilación. Se encontraron probables secuencias de reconocimiento para la N-glicosilación en todas las *OnAPN* analizadas, pero solamente *OnAPN1*, *OnAPN3a* y *OnAPN3b* contenían dianas para la O-glicosilación. Todos los sitios de O-glicosilación encontrados coincidieron con el aminoácido treonina. En la Tabla 18 están listados los sitios de glicosilación para cada proteína.

Tabla 18. Sitios glicosilación identificados *in silico* en las *OnAPN*. Se utilizaron los programas NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 3.1 para identificar los sitios probables de N-glicosilación y O-glicosilación, respectivamente.

Proteína	N. de sitios de O-glicosilación	Posición	N. de sitios de N-glicosilación	Posición
<i>OnAPN1</i>	1	953	4	87, 227, 277, 296
<i>OnAPN2</i>	0	-	10	52, 60, 70, 95, 207, 478, 547, 602, 799, 915
<i>OnAPN3a</i>	5	969, 974, 976, 984, 985	9	111, 181, 186, 217, 237, 313, 681, 771, 872
<i>OnAPN3b</i>	3	976, 977, 979	4	218, 642, 681, 872
<i>OnAPN4</i>	0	-	5	135, 251, 374, 420, 810
<i>OnAPN8</i>	0	-	8	25, 81, 94, 254, 405, 470, 520, 563

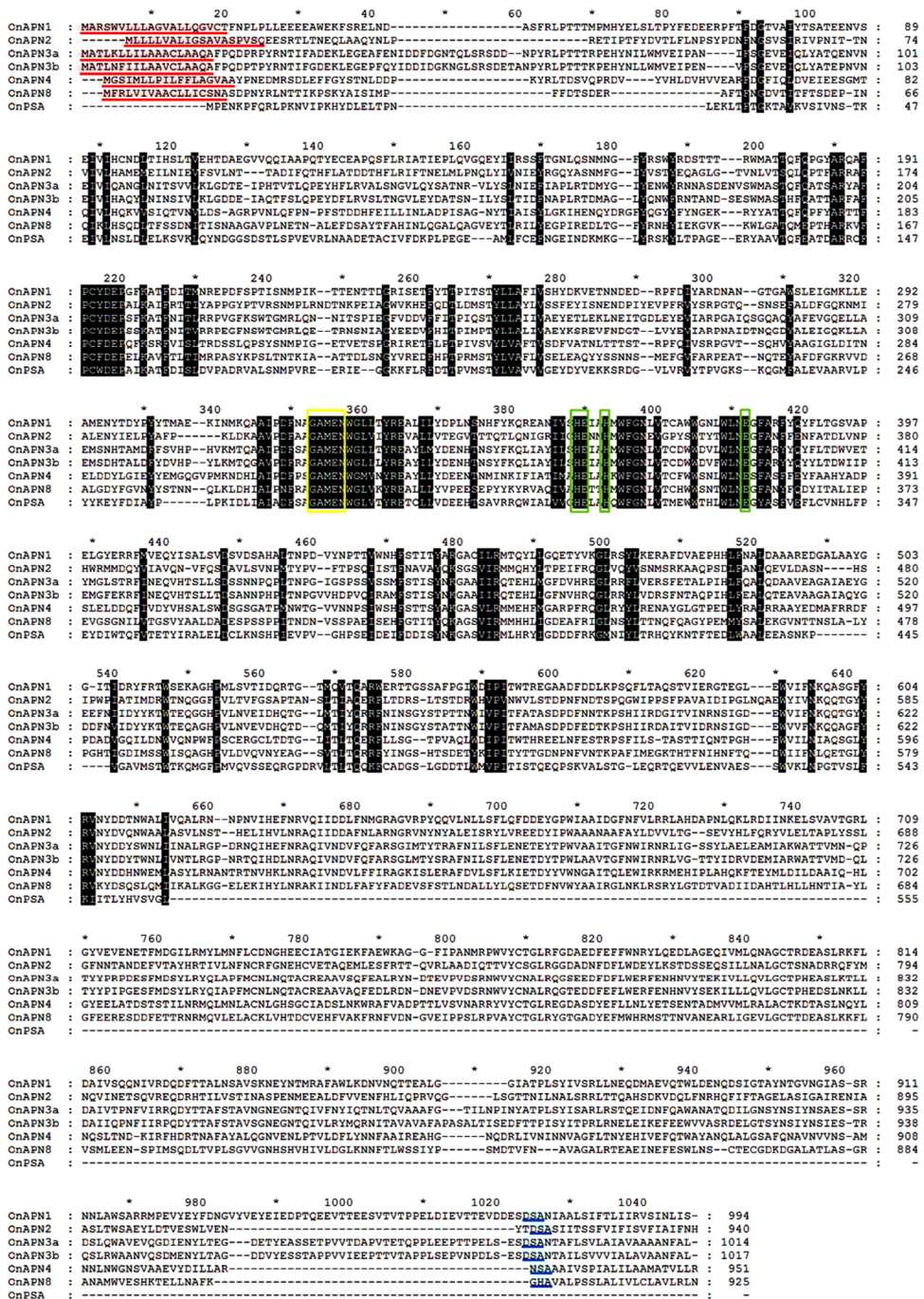


Figura 36. Alineamiento realizado por ClustalX de las secuencias aminoácidas de las aminopeptidasas de *O. nubilalis*. En negro se resaltan los aminoácidos conservados; la secuencia del dominio señal está subrayada en rojo y la del anclaje GPI en azul. Los dominios típicos de las aminopeptidasas GAMEN y HEXXE(X)₁₈E están enmarcados en amarillo y verde, respectivamente.

4.3.2 Análisis filogenético

El análisis filogenético de las siete proteínas traducidas *in silico* junto con las aminopeptidasas de lepidópteros descritas en la base de datos GenBank y las aminopeptidasas anotadas en el genoma de *B. mori*, nos permitieron clasificar y nombrar las siete aminopeptidasas clonadas (Figura 37). Seis de ellas tenían alta homología con otras APN de lepidópteros, y siguiendo la clasificación propuesta por Herrero y colaboradores (2005) recayeron dentro de los grupos 1, 2, 3, 4 y 8. Este último grupo se definió a partir de los hallazgos de este trabajo y, además de *OnAPN8*, cuenta con otra proteína codificada por un gen de *B. mori* contenido en la secuencia *bgibmga008063* así como con otra secuencia parcial descrita en *S. litura*.

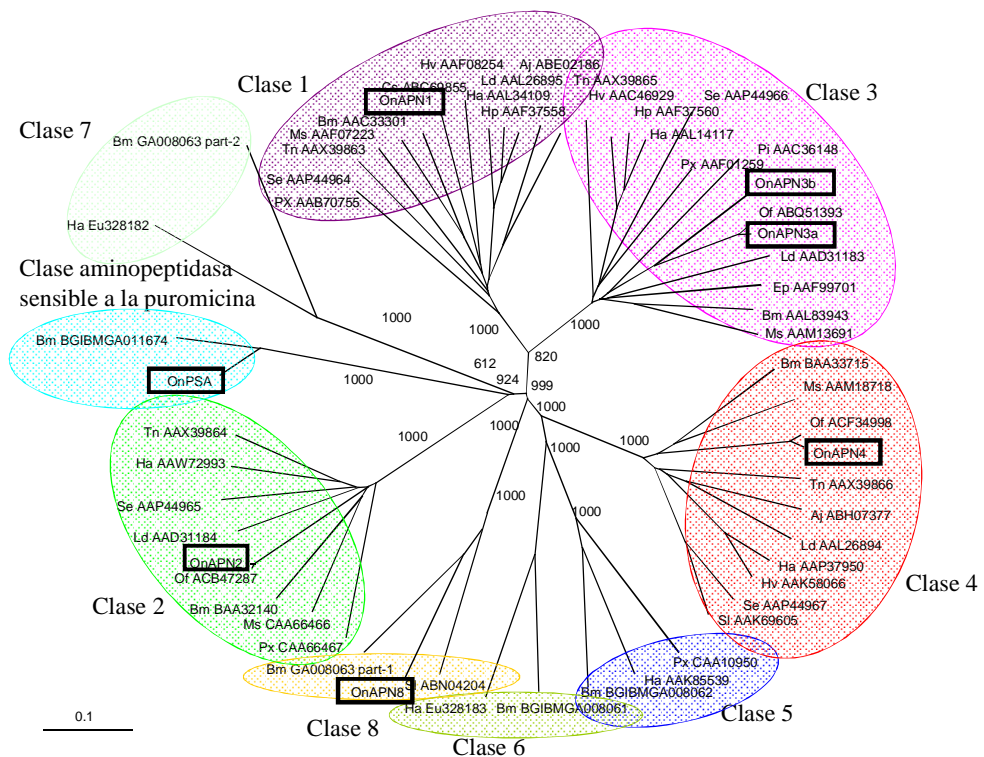


Figura 37. Árbol filogenético de las aminopeptidasas de lepidópteros. Se construyó a partir del alineamiento generado por ClustalX de todas las secuencias aminoacídicas completas de las aminopeptidasas de lepidópteros publicadas en las bases de datos Genbank y Silkworm Genome Database hasta final de 2009 y con las secuencias casi enteras de *S. litura* APN8 y *P. xylostella* APN3. Los números de acceso de cada secuencia están indicados. Ha: *H. armigera*, Hp: *H. punctigera*, Hv: *H. virescens*, On: *O. nubilalis*, Of: *O. furnacalis*, Px: *P. xylostella*, Bm: *B. mori*, Ms: *M. sexta*, Se: *S. exigua*, Sl: *S. litura*, Ep: *Ephipyas postvittiana*, Tn: *T. ni*, Ld: *L. dispar*, Aj: *Achea janata*, Pi: *P. interpunctella*, Cs: *C. suppressalis*. Los valores de bootstrap están indicados para los nodos principales. Circunscritos en un rectángulo se resaltan las APN identificadas y secuenciadas en el presente trabajo.

Contrariamente a lo descrito hasta el momento, en que solamente se había asignado y caracterizado una APN por cada grupo filogenético dentro de una misma especie de lepidópteros, dos de las secuencias clonadas de *O. nubilalis* se clasificaron como miembros de la clase 3, por lo cual se nombraron *OnAPN3a* y *OnAPN3b*. Estas dos secuencias presentaban una identidad del 74% y una similitud del 86%, por lo que se descartó el que se tratara de dos alelos del mismo gen. El porcentaje de identidad entre las *OnAPN* pertenecientes a diferentes grupos iba del 25 hasta el 39%, mientras que *OnPSA* resultó ser la más diferente, compartiendo solo un 15 – 18% de identidad con las otras aminopeptidasas (Tabla 19).

Tabla 19. Valores de identidad aminoacídica entre las aminopeptidasas de *O. nubilalis*. Los valores fueron obtenidos mediante el programa ClustalX.

	<i>OnAPN1</i>	<i>OnAPN2</i>	<i>OnAPN3a</i>	<i>OnAPN3b</i>	<i>OnAPN4</i>	<i>OnAPN8</i>
<i>OnAPN2</i>	26%	100%				
<i>OnAPN3a</i>	39%	25%	100%			
<i>OnAPN3b</i>	39%	25%	74%	100%		
<i>OnAPN4</i>	31%	25%	27%	27%	100%	
<i>OnAPN8</i>	28%	26%	28%	28%	32%	100%
<i>OnPSA</i>	15%	16%	16%	15%	16%	18%

La *OnPSA* no se agrupó con ninguna de las demás APN si no con la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) de *B. mori*. Esta proteína, también llamada alanil-aminopeptidasa citosólica (Stoltze *et al.*, 2000), es una aminopeptidasa localizada en el citosol de las células y de la cual hay muy pocas isoformas descritas en lepidópteros. La comparación de *OnPSA* con las proteínas homólogas descritas en *D. melanogaster* y en humano (con las cuales presentaba una identidad del 42% y del 36% respectivamente), nos permitió confirmar la clasificación de *OnPSA* en un grupo aparte, así como confirmar el hecho de que el ADNc que clonamos, muy probablemente codificaba para una proteína truncada de 555 aminoácidos ya que las proteínas homólogas descritas en *B. mori* y *D. melanogaster* tenían tamaños son 865 y 866 aminoácidos respectivamente (Figura 38).

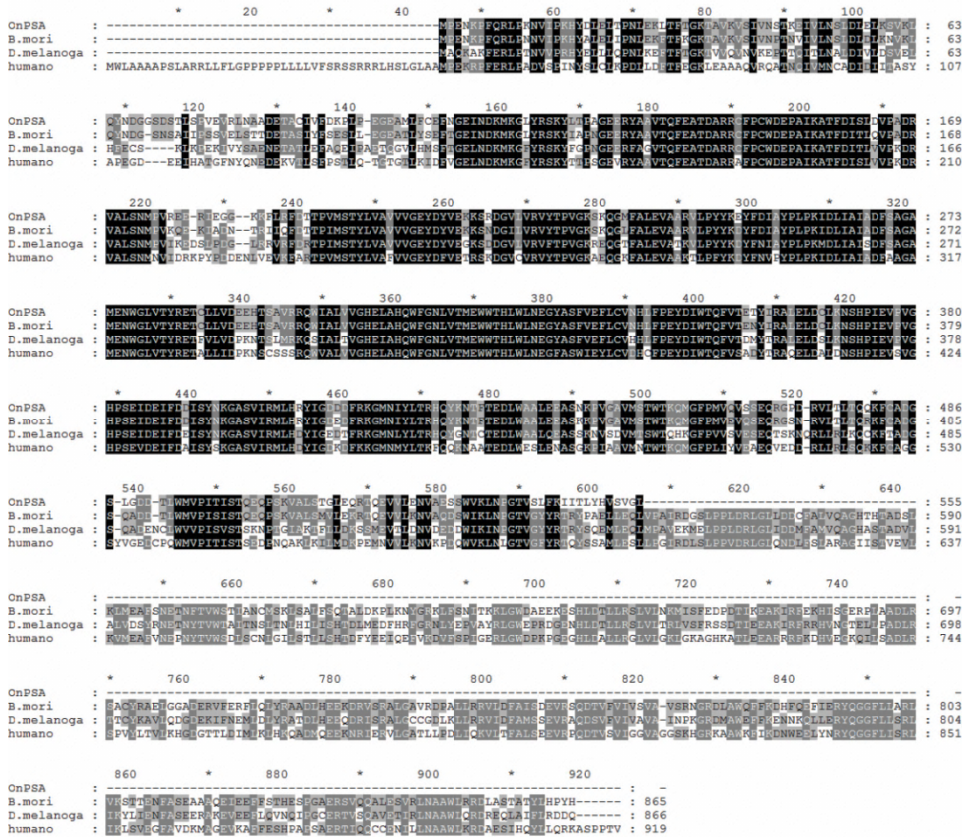


Figura 38. Alineamiento con el programa ClustalX de la secuencia aminoacídica de *OnPSA* con las proteínas homólogas de *B. mori* (BGIBMGA011674), *D. melanogaster* (NP728618) y *Homo sapiens* (P55786). En negro se destacan los aminoácidos conservados entre las cuatro secuencias, en gris oscuro los aminoácidos conservados entre tres secuencias y en gris claro entre dos secuencias.

4.3.3 Identificación y caracterización *in silico* de los genes ortólogos a las aminopeptidasas de *O. nubilalis* en el genoma de *B. mori*

El gusano de la seda, *B. mori*, está considerado como lepidóptero modelo, y en la actualidad es el único lepidóptero cuyo genoma está totalmente secuenciado y disponible en internet. Para localizar los genes ortólogos de las aminopeptidasas de *O. nubilalis* realizamos un análisis con la herramienta BLAST, comparando las secuencias clonadas con la base de datos de secuencias nucleotídicas del genoma de *B. mori*. Identificamos tres genes (*bgibmga008017*, *bgibmga008060* y *bgibmga011674*) que correspondían a *onapn2*, *onapn4* y *onpsa* y que nombramos de forma correspondiente como *bmapn2*, *bmapn4* y *bmps*. La secuencia ortóloga de *onapn8* fue encontrada dentro de una secuencia de 44,7 kb anotada como

bgibmga008063 y que contenía, además del gen definido como *bmapn8*, otra secuencia que después del análisis tBLASTn resultó ser ortóloga del gen codificante para APN7 de *H. armígera* y que nombramos *bmapn7*. De forma similar, el gen *bgibmga008059* estaba erróneamente anotado, porque contenía las secuencias de los dos genes correspondientes a *onapn1* y *onapn3a* (*bmapn1* y *bmapn3*) juntos. Ningún ortólogo de *onapn3b* fue encontrado en el genoma de *B. mori*, confirmando que la presencia de dos APN pertenecientes a la clase 3 era una característica de *O. nubilalis*.

El análisis filogenético con el programa ClustalX determinó que la identidad aminoacídica de las aminopeptidasas de *O. nubilalis* traducidas *in silico* con sus ortólogas en *B. mori* variaba del 54 hasta el 67% (Tabla 20), un valor mucho más alto que el obtenido comparando las diferentes clases de aminopeptidasas de *O. nubilalis* entre sí (Tabla 19).

Tabla 20. Valores de identidad aminoacídica entre las aminopeptidasas de *B. mori* y *O. nubilalis*. Los valores han sido obtenidos con el programa ClustalX. En negro y enmarcados se resaltan los valores obtenidos para las APN ortólogas de ambas especies.

	<i>BmAPN1</i>	<i>BmAPN2</i>	<i>BmAPN3</i>	<i>BmAPN4</i>	<i>BmAPN8</i>	<i>BmPSA</i>
<i>OnAPN1</i>	62%	24%	39%	27%	29%	24%
<i>OnAPN2</i>	26%	67%	24%	24%	25%	23%
<i>OnAPN3a</i>	37%	23%	66%	28%	27%	20%
<i>OnAPN3b</i>	38%	24%	62%	26%	27%	20%
<i>OnAPN4</i>	30%	23%	27%	62%	30%	21%
<i>OnAPN8</i>	30%	25%	29%	30%	59%	24%
<i>OnPSA</i>	16%	16%	15%	15%	16%	54%

Los cinco genes ortólogos de las *onapn* se localizan todos juntos en la misma región del genoma de *B. mori*, denominada nscaf2889, que se ubica en el cromosoma 9. En la misma zona hay otros genes que codifican para aminopeptidasas, y que son el gen *bgibmga008062* (*bmapn5*), el gen *bgibmga008061* (*bmapn6*), el gen *bmapn7*, que se encuentra anotado como parte de la secuencia *bgibmga008063* y el gen *bgibmga008018* que codifica para otra aminopeptidasa (Figura 39). El gen ortólogo de *onpsa* se localiza en otra zona (nscaf3031) ubicada en el cromosoma 11, y no se encuentra cerca de ninguna otra aminopeptidasa reconocible.

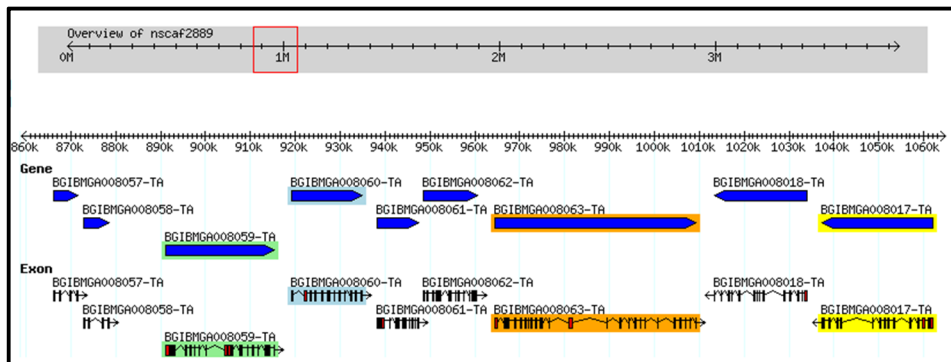


Figura 39. Localización de los genes ortólogos de las *apn* de *O. nubilalis* en el cromosoma 9 de *B. mori*. La figura muestra la región cromosómica en la que se localizan los genes de las APN de *B. mori*. En verde esta resaltada la secuencia que contiene los genes ortólogos a *onapn1* y *onapn3a*, en azul claro el gen ortólogo a *onapn4*, en naranja la secuencia que contiene el gen ortólogo a *onapn8* y en amarillo el ortólogo a *onapn2* (Silkworm Genome Database).

Tras identificar los genes ortólogos en *B. mori*, realizamos un pequeño estudio *in silico* de sus perfiles de expresión, extrapolándolos de la base de datos de micromatrices de *B. mori* que contiene los niveles de expresión en larvas a comienzo del quinto estadio de desarrollo de todos los genes presentes en el genoma de *B. mori*. Encontramos que nueve sondas estaban directamente relacionadas con las *bmapn* y con *bmpsa*, e identificamos una décima sonda (sw17741), clasificada como aminopeptidasa (pero no directamente relacionada a ninguna *bmapn*) como propia de *bmapn3*. Se confirmó la correcta asignación de cada sonda alineándola con la región codificante de la aminopeptidasa correspondiente. Los transcritos de *bmapn2*, *bmapn3* y *bmapn8* estaban representados por más de una sonda. Los perfiles de expresión resultante de las micromatrices están esquematizados en la Tabla 21. Todos los genes estaban fuertemente expresados en el intestino de las larvas, mientras que sólo tres transcritos se expresaban también en los túbulos de Malpighio, entre ellos, *bmpsn1* y *bmpsn8*, tenían altos niveles de expresión, y *bmpsn3* mostraba un nivel de expresión casi nulo. Así mismo, *bmapn1* resultaba levemente expresada fuera del intestino, en la cabeza y en el tegumento. El patrón de expresión del gen *bmpsa* se diferenció claramente del resto ya que presentaba una expresión ubicua, detectable en todos los tejidos estudiados.

Tabla 21. Intensidades de la señal obtenidas en el análisis con micromatrices de los niveles de expresión de los genes *apn* de *B. mori*. Datos extrapolados de Xia *et al.* (2007). El análisis se realizó con ARN de diferentes tejidos de larvas de quinto estadio. Valores mayores de 400 (negrita) significan que el transcrito correspondiente está expresado de forma significativa.

Gen	Sonda	Intestino	Túbulos de Malpighio	Cuerpo graso	Gónadas	Glándulas salivales	Hemocitos	Tegumento	Cabeza
<i>bmapn1</i>	sw03042	99934 (± 9254)	1422 (± 270)	167 (± 50)	161 (± 28)	82 (± 16)	286 (± 100)	598 (± 110)	654 (± 60)
<i>bmapn2</i>	sw05220	2763 (± 252)	66 (± 15)	28 (± 19)	18 (± 14)	36 (± 14)	101 (± 73)	45 (± 18)	52 (± 12)
<i>bmapn2</i>	sw04261	809 (± 88)	18 (± 19)	-11 (± 15)	5 (± 7)	19 (± 3)	14 (± 7)	-2 (± 20)	22 (± 14)
<i>bmapn2</i>	sw10041	30274 (± 2139)	271 (± 66)	266 (± 58)	42 (± 30)	110 (± 17)	69 (± 22)	204 (± 37)	396 (± 80)
<i>bmapn3</i>	sw17741	33099 (± 3405)	318 (± 55)	25 (± 25)	32 (± 17)	16 (± 6)	77 (± 34)	55 (± 42)	3 (± 26)
<i>bmapn3</i>	sw18255	147035 (± 10534)	629 (± 121)	42 (± 17)	36 (± 23)	64 (± 12)	213 (± 119)	83 (± 24)	187 (± 52)
<i>bmapn4</i>	sw19250	57729 (± 5841)	317 (± 94)	89 (± 54)	10 (± 17)	18 (± 4)	77 (± 43)	120 (± 26)	126 (± 36)
<i>bmapn8</i>	sw06103	6352 (± 389)	2088 (± 226)	3 (± 8)	18 (± 11)	20 (± 4)	5 (± 7)	13 (± 12)	15 (± 8)
<i>bmapn8</i>	sw02792	711 (± 126)	435 (± 50)	54 (± 16)	39 (± 6)	115 (± 16)	59 (± 13)	65 (± 37)	47 (± 7)
<i>bmpsa</i>	sw09454	1339 (± 70)	1613 (± 212)	758 (± 40)	2510 (± 253)	1296 (± 75)	1653 (± 158)	1588 (± 129)	1991 (± 159)

4.3.4 Patrón de expresión de los genes *onapn* y *onpsa*

La expresión de cada *onapn* se determinó en diferentes estadios de desarrollo de las larvas y también en diferentes tejidos larvarios utilizando dos aproximaciones diferentes: RT-PCR y RT-qPCR.

La expresión de las aminopeptidasas en diferentes momentos del desarrollo larvario se determinó mediante RT-PCR, utilizando ARN total de larvas recién nacidas o de 7 días de edad o ARN total de los intestinos de larvas de 14, 21 y 28 días de edad, todas procedentes de la colonia LAB. Los productos de amplificación tenían un tamaño de 399 pb para *onapn1*, 286 pb para *onapn2*, 391 pb para *onapn3a*, 473 pb para *onapn3b*, 421 pb para *onapn4*, 590 pb para *onapn8* y 560 pb para *onpsa* y fueron secuenciados para confirmar su especificidad. Mediante este análisis se detectó la presencia constante de todos los transcritos a lo largo del desarrollo larvario (Figura 40).

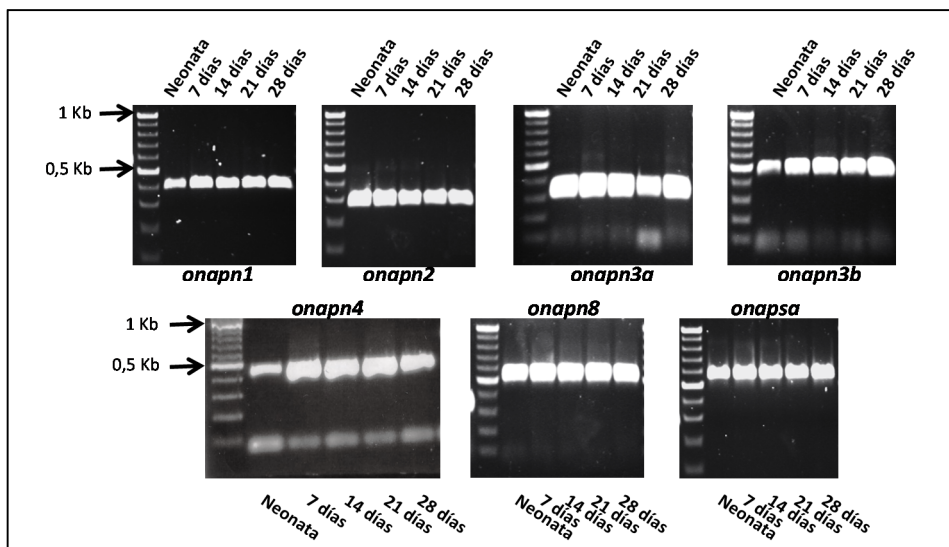


Figura 40. Resultados del análisis con RT-PCR de la expresión de las aminopeptidasas de *O. nubilalis* en diferentes estadios de desarrollo larvario. Los productos de PCR han sido separados en gels de agarosa 1% y teñidos con bromuro de etidio. Los tamaños de las bandas mayoritarias del marcador de peso molecular están señalados con flechas.

Para la determinación del patrón de expresión espacial de las aminopeptidasas se empleó la técnica de la RT-qPCR que nos permitía cuantificar la expresión de los genes en cada tejido. Se diseccionaron larvas de quinto estadio de la colonia LAB y se purificó el ARN total a partir de intestino, túbulos de Malpighio, cuerpo graso y tegumento. El análisis de las curvas de temperatura de

fusión del ADNc, obtenidas al final de las reacciones de amplificación de la RT-qPCR, nos permitió confirmar la presencia de un solo fragmento amplificado por cada reacción.

Todas las aminopeptidasas se encontraron expresadas a altos niveles en el intestino de las larvas, mientras que la expresión en los otros tejidos era variable (Figura 41). Se detectó expresión de los genes *onapn3a*, *onapn4* y *onapn8* en los túbulos de Malpighio, aunque cabe destacar que mientras que la expresión de *onapn8* en este tejido era comparable con su expresión en el intestino, la expresión de *onapn3a* y *onapn4* resultó ser mínima (700 y 400 veces menos que en el intestino, respectivamente), lo que apunta a que quizás este último resultado sea consecuencia de una contaminación sufrida en el momento de la disección de los tejidos larvarios. De la misma forma podría decirse que los transcritos de *onapn3a* detectados en el cuerpo graso (2000 veces menos que en el intestino) podrían deberse a una posible contaminación.

En el caso del gen *onpsa*, se evidenció un patrón de expresión totalmente diferente: su transcrito se encontró, de forma consistente, en todos los tejidos analizados. Los niveles de expresión más altos se detectaron en el intestino y en los túbulos de Malpighio, entre los cuales no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa. La presencia del transcrito disminuyó a un tercio en el cuerpo graso y a un quinto en el tegumento respecto a los niveles hallados en intestino (Figura 41).

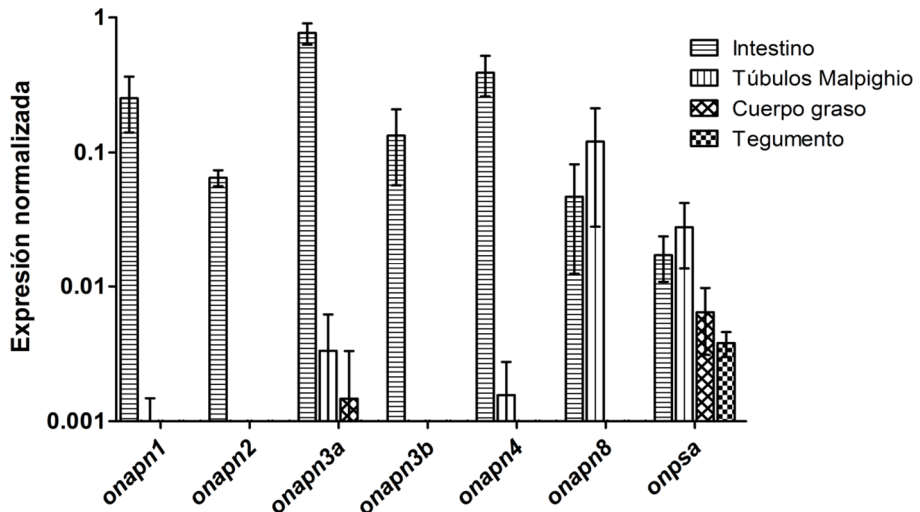


Figura 41. Patrón de expresión espacial de las aminopeptidasas de *O. nubilalis* en diferentes tejidos larvarios analizados por RT-qPCR. Los niveles de expresión están normalizados respecto a la expresión del gen de referencia *s3*. Las barras verticales representan la media de tres replicas biológicas \pm SE ($N = 3$).

4.3.5 Expresión heteróloga de las *onAPN* en células Sf21

La expresión de las proteínas *OnAPN1*, *OnAPN2*, *OnAPN3a*, *OnAPN3b*, *OnAPN4* y *OnAPN8* se realizó mediante la infección de células cultivadas Sf21, procedentes de ovarios de *S. frugiperda*, con los lotes P₁ de los baculovirus recombinantes. Se determinó la multiplicidad de infección (MOI) adecuada que en 72 h permitía infectar más del 90% de células. Por cada virus, se compararon las MOI 1, 3 y 10 y los niveles de infección producidos se determinaron contando el número de células que expresaban el gen chivato *gfp*, insertado en los virus bajo el promotor viral p10. En la figura 42 se puede apreciar, a modo de ejemplo, la expresión de la proteína GFP, 72 hpi utilizando diferentes MOI del virus *Ac_pFBΔ_p10GFP_phOnAPN3b*.

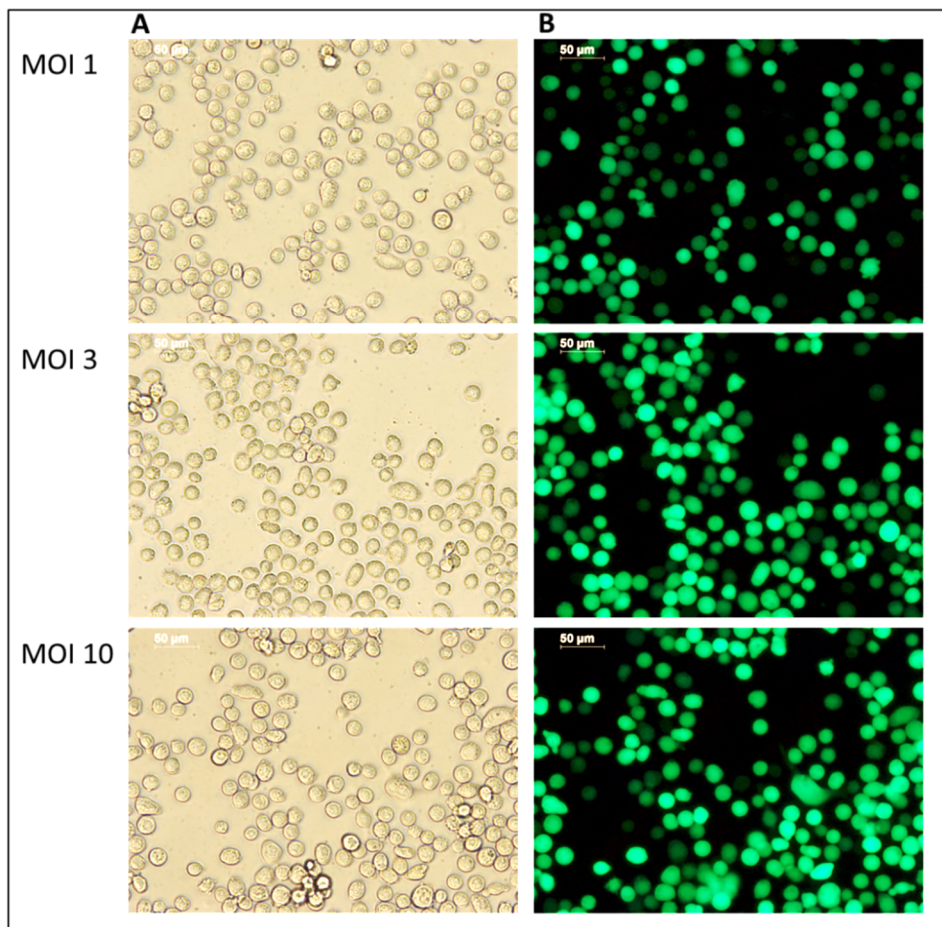


Figura 42. Niveles de expresión de la proteína GFP en células Sf21 infectadas. Expresión de GFP provocada por la infección del baculovirus recombinante *Ac_pFBΔ_p10GFP_phOnAPN3b* a diferentes MOI (1, 3 y 10) 72 hpi. A). Imagen obtenida por microscopía de contraste de fases, B) Detección de la fluorescencia debida a la expresión de GFP.

La MOI más adecuada para producir una infección mayor del 90% resultó ser MOI 3. Los mismos resultados se obtuvieron para todos los baculovirus recombinantes (datos no mostrados), incluido el baculovirus control *Ac_pFBA_p10GFP_phX*.

La expresión de cada *OnAPN* se visualizó por SDS-PAGE y por inmunodetección de la cola de histidinas que había sido añadida durante el clonaje (Figura 43). Los resultados de SDS-PAGE mostraron que la infección de las células Sf21 con los virus recombinantes inducía la expresión de proteínas de un tamaño comprendido entre 100 y 150 kDa, que no estaban presentes entre las proteínas de las células infectadas con el baculovirus control (Figura 43A) y cuya identidad se debía probablemente a la expresión de las *OnAPN*. El tamaño aparente y la intensidad de estas proteínas expresadas en células Sf21 diferían entre isoformas de *OnAPN*. Las proteínas de mayor tamaño parecieron ser las *OnAPN1* y *OnAPN3a*, seguidas por las *OnAPN3b*, *OnAPN8* y *OnAPN2*, respectivamente. Estos tamaños aparentes están concordes con las masas calculadas *in silico* (tabla 17): las *OnAPN1*, *OnAPN3a* y *OnAPN3b* tienen un tamaño predicho de 113, 115 y 116 kDa mientras que las *OnAPN8* y *OnAPN2* son las isoformas más pequeñas, de 104 y 107 kDa respectivamente.

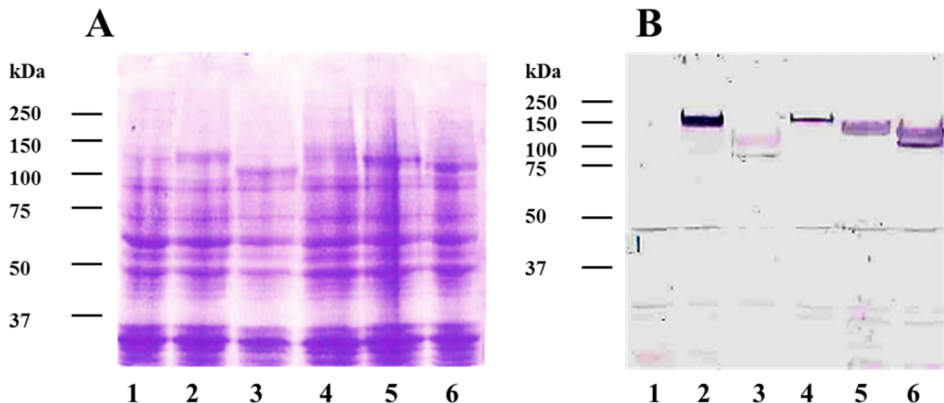


Figura 43. Análisis de la expresión de las *OnAPN* en células Sf21. A) Proteínas totales de las células Sf21 infectadas con baculovirus recombinantes separadas por SDS-PAGE 10% y teñidas con azul de Coomassie; B) Inmunodetección de proteínas con cola de histidina. Carreras 1 - 6 células infectadas con 1) *Ac_pFBA_p10GFP_phX*, 2) *Ac_pFBA_p10GFP_phOnAPN1*, 3) *Ac_pFBA_p10GFP_phOnAPN2*, 4) *Ac_pFBA_p10GFP_phOnAPN3a*, 5) *Ac_pFBA_p10GFP_phOnAPN3b*, 6) *Ac_pFBA_p10GFP_phOnAPN8*.

La inmunodetección de la cola de histidinas no detectó ninguna proteína de tamaño de alrededor de 100-150 kDa en las células Sf21 infectadas con el baculovirus control (Figura 43B), mostrando la especificidad del anticuerpo. Entre las proteínas de las células infectadas con los virus para la expresión de las *OnAPN*

se detectaron unas bandas cuyo tamaño correlacionaba con las bandas previamente identificadas por SDS-PAGE. Cabe señalar que el anticuerpo anti-histidinas reconoció en cada muestra dos bandas de tamaño similar, una mucho más débil que la otra, cuya dimensión variaba según la *OnAPN* expresada.

La expresión de la isoforma *OnAPN4* no se pudo detectar por SDS-PAGE ni por inmunodetección (datos no mostrados). Para comprobar que la infección con el virus *Ac_pFBA_p10GFP_phOnAPN4* no conducía a la expresión de la *OnAPN4*, utilizamos las células infectadas con el baculovirus para un ensayo cualitativo de actividad aminopeptidásica. No obteniendo ninguna diferencia de actividad enzimática respecto a las células control infectadas con el virus *Ac_pFBA_p10GFP_phX*, concluimos que el baculovirus recombinante que construimos no era efectivo para la expresión de *OnAPN4* y por tanto lo descartamos para los siguientes análisis.

4.3.6 Caracterización de la actividad aminopeptidásica

4.3.6.1. Especificidad de sustrato

La clasificación de las *OnAPN* (y de muchas de las isoformas descritas en lepidópteros hasta ahora) se basa sobre el análisis filogenético de las secuencias, sin ninguna evidencia experimental de la actividad enzimática de estas proteínas. Para confirmar la presencia de tal actividad, se caracterizó la especificidad de sustrato de las isoformas de *OnAPN* expresadas en células Sf21 utilizando tres diferentes sustratos cromogénicos sintéticos. Puesto que las APN cortan los aminoácidos neutrales de la extremidad N-terminal de las proteínas, se ensayaron dos diferentes sustratos de este tipo: leu-*pNA* y ala-*pNA*. Adicionalmente se probó un sustrato básico, lys-*pNA*. El control negativo fueron las células Sf21 infectadas con el virus *Ac_pFBA_p10GFP_phX*, que expresaban únicamente el gen *gfp*. En estas células se detectaron pequeños niveles de actividad aminopeptidásica basal (Tabla 22). Estos niveles variaban de 5,9 mU/mg utilizando el sustrato leu-*pNA*, hasta 15,8 mU/mg con el sustrato lys-*pNA*. Los resultados obtenidos con las células Sf21 infectadas con los virus para la expresión de las *OnAPN* mostraron actividad enzimática por parte de todas las *OnAPN*, con la excepción de *OnAPN3b* (Tabla 22). Por tanto, cuatro de las cinco isoformas expresadas en las células Sf21 retenían la actividad biológica bajo nuestras condiciones experimentales.

Los ensayos con las células infectadas que expresaban *OnAPN3b* no evidenciaron ninguna diferencia significativa respecto al control para ninguno de los sustratos ensayados ($P > 0,05$), demostrando que esta isoforma no tenía actividad

en las condiciones de ensayo empleadas. Las isoformas que presentaron actividad aminopeptidásica resultaron hidrolizar de forma diferente los dos sustratos neutrales y el sustrato básico (Tabla 22). Así, la *OnAPN1* hidrolizaba de forma más eficiente leu-*pNA* que ala-*pNA* o lys-*pNA*, con los cuales daba una actividad mínima. *OnAPN2* tenía la misma afinidad para ambos sustratos neutrales, mientras que tenía una actividad mucho más baja con el sustrato básico. *OnAPN3a* hidrolizaba eficientemente los tres sustratos utilizados, de la misma manera que *OnAPN8*. Ésta fue la única isoforma que tuvo una mayor actividad enzimática cuando se ensayó con ala-*pNA* respecto a leu-*pNA*. En el caso de las dos isoformas capaces de hidrolizar el sustrato básico (*OnAPN3a* y *OnAPN8*), la actividad enzimática con éste fue siempre más baja que la obtenida con los sustratos neutrales.

Tabla 22. Actividad aminopeptidásica de las células Sf21 infectadas con los baculovirus para la expresión de las *OnAPN* o con el baculovirus control. Los resultados representan la media (\pm SE) de tres ensayos independientes.

Isoforma	Leu- <i>pNA</i> (mU/mg)	Ala- <i>pNA</i> (mU/mg)	Lys- <i>pNA</i> (mU/mg)
Control neg.	5.9 (\pm 1.6)	6.0 (\pm 0.6)	15.8 (\pm 5.5)
<i>OnAPN1</i>	191.8 (\pm 13.5) ^a	35.8 (\pm 7.7) ^b	37.9 (\pm 7.9) ^b
<i>OnAPN2</i>	251.5 (\pm 35.1) ^a	249.0 (\pm 19.4) ^a	32.4 (\pm 5.0) ^b
<i>OnAPN3a</i>	370.1 (\pm 28.6) ^{ab}	399.9 (\pm 32.1) ^a	263.7 (\pm 11.2) ^b
<i>OnAPN3b</i>	5.2 (\pm 1.0)	6.3 (\pm 0.3)	10.9 (\pm 3.0)
<i>OnAPN8</i>	2099 (\pm 162.7) ^a	2808 (\pm 154.4) ^b	961.6 (\pm 51.7) ^c

*Las letras indican diferencias significativas entre sustratos (P<0,05)

4.3.6.2 Sensibilidad a inhibidores

Las células que expresaban las proteínas *OnAPN1*, *OnAPN2*, *OnAPN3a* y *OnAPN8* y que demostraron la capacidad de hidrolizar sustratos neutrales se utilizaron para ensayar tres inhibidores sintéticos de la actividad enzimática: bestatina, actinonina y el agente quelante EDTA. Cada *OnAPN* mostró un perfil de inhibición característico y no todos los inhibidores fueron siempre efectivos, excepto por el EDTA a concentraciones superiores a 10 mM.

El primer enzima ensayado, *OnAPN1*, se mostró insensible a los dos inhibidores competitivos ensayados: la concentración más alta de bestatina así como de actinonina no provocó una disminución detectable de la actividad aminopeptidásica (Figura 44). Por el contrario, la incubación con el EDTA sí disminuyó significativamente la actividad de la *OnAPN1*: una concentración de 10 mM causó una reducción del 30% de la hidrolisis del sustrato mientras que una

concentración de 100 mM inhibió casi totalmente el enzima (92% de reducción) (Figura 44).

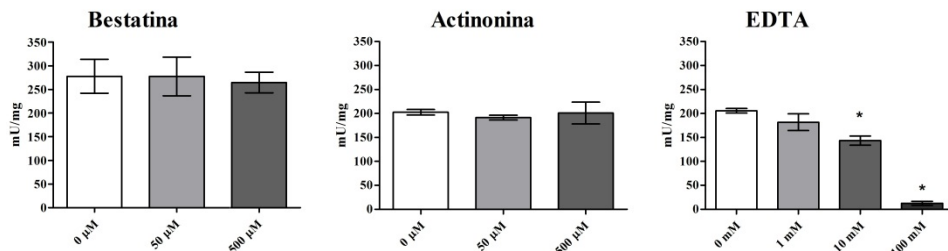


Figura 44. Inhibición de *OnAPN1*. Actividad aminopeptidásica de la isoforma *OnAPN1* ensayada con el sustrato leu-pNA a diferentes concentraciones de los inhibidores bestatina, actinonina y EDTA. Las barras verticales representan la media de tres ensayos independientes \pm SE. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control.

La actividad de la *OnAPN2* resultó inhibida tras la incubación con bestatina y EDTA. La bestatina a la concentración de 500 µM causó una disminución de la actividad del 50% mientras que la reducción provocada por la misma concentración de actinonina (20%) no resultó ser significativamente diferente del control (Figura 45). El EDTA a una concentración de 100 mM redujo la actividad enzimática de la *OnAPN2* de un 70% mientras que una concentración de 10 mM provocó una disminución mínima (15%).

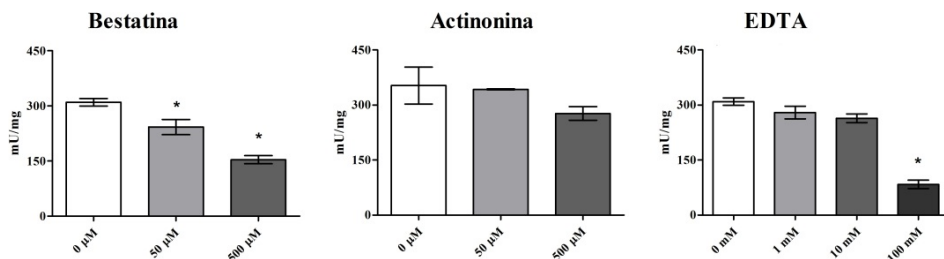


Figura 45. Inhibición de *OnAPN2*. Actividad aminopeptidásica de la isoforma *OnAPN2* ensayada con el sustrato leu-pNA a diferentes concentraciones de los inhibidores bestatina, actinonina y EDTA. Las barras verticales representan la media de tres ensayos independientes \pm SE. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control.

Los efectos de bestatina y actinonina sobre la actividad de la *OnAPN3a* produjeron una cierta disminución de la actividad a la concentración más alta de ambos inhibidores competitivos. La bestatina a una concentración de 500 µM provocó una reducción de la actividad del 21%, mientras que la misma concentración de actinonina causó una reducción del 19%. El efecto del EDTA a una concentración de 10 mM no resultó significativo (reducción del 13%) mientras que tras la incubación con EDTA 100 mM la reducción de la actividad fue del 84% (Figura 46).

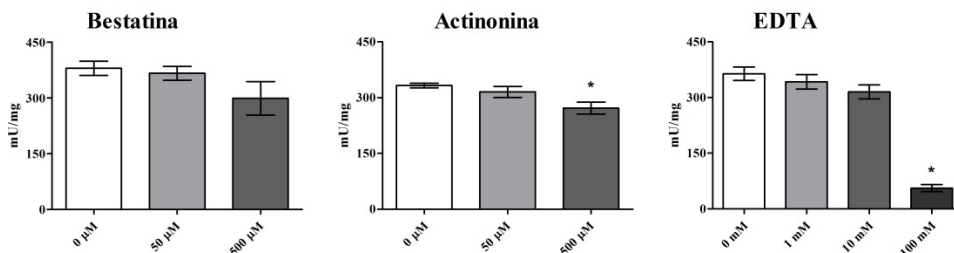


Figura 46. Inhibición de *OnAPN3a*. Actividad aminopeptidásica de la isoforma *OnAPN3a* ensayada con el sustrato leu-pNA a diferentes concentraciones de los inhibidores bestatina, actinonina y EDTA. Las barras verticales representan la media de tres ensayos independientes \pm SE. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control.

La proteína *OnAPN8* demostró ser la isoforma más susceptible a todos los inhibidores ensayados. Este enzima fue totalmente susceptible a la bestatina, ya que una concentración de 50 μ M disminuyó la actividad enzimática en un 73% mientras que la incubación con una concentración diez veces más alta redujo la actividad casi a cero (93% de inhibición). La actinonina a una concentración de 500 μ M causó una reducción de la actividad del 35%, mientras que el EDTA, ensayado a la concentración de 10 mM ya redujo la actividad del 56% y a 100 mM produjo una inhibición de la actividad del 95% (Figura 47).

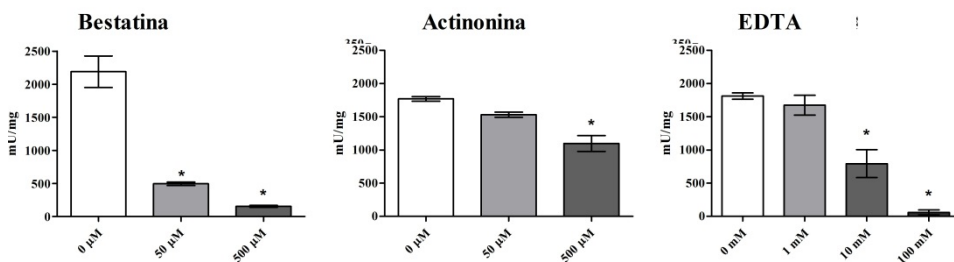


Figura 47. Inhibición de *OnAPN8*. Actividad aminopeptidásica de la isoforma *OnAPN8* ensayada con el sustrato leu-pNA a diferentes concentraciones de los inhibidores bestatina, actinonina y EDTA. Las barras verticales representan la media de tres replicas biológicas \pm SE ($N = 3$).

4.4 INTERACCIÓN DE LAS *OnAPN* CON LAS PROTEÍNAS Cry

4.4.1 Ensayos de unión de las proteínas Cry

La interacción entre la toxinas Cry y cada una de las *OnAPN* expresadas en las células Sf21, se dilucidó incubando dichas células con la proteína Cry1Ab o Cry1F y, tras procesar la preparación, detectando la presencia o ausencia de estas últimas en la superficie mediante inmunohistoquímica. La unión de la

proteína Cry1Ab a las células Sf21 que expresaban las distintas *OnAPN* evidenció que ésta solamente se unía a la superficie de las células que expresaban *OnAPN1*, indicando una interacción entre esta isoforma y la toxina (Figura 48). Ninguna señal debida a la presencia de la proteína Cry1Ab se detectó en las células control, que expresaban únicamente GFP, al igual que ocurrió con las células que expresaban las *OnAPN2*, *OnAPN3a*, *OnAPN3b* y *OnAPN8*.

La presencia de la proteína Cry1F se inmunodetectó en la superficie de las células que expresaban las *OnAPN3a* y *OnAPN8*, indicando que estas dos isoformas eran capaces de unir a la proteína Cry1F (Figura 49). También se encontró unión (aunque la señal detectada parece más débil que en los casos anteriores) entre la proteína Cry1F y la *OnAPN1* que, como se ha mencionado anteriormente, había resultado capaz de unirse también a la proteína Cry1Ab. No se detectó ninguna interacción entre la proteína Cry1F y las células control, infectadas con el virus *Ac_pFBD_p10GFP_phX*. Tampoco se pudo demostrar unión de la proteína Cry1F a las células que expresaban *OnAPN2* y *OnAPN3b*.

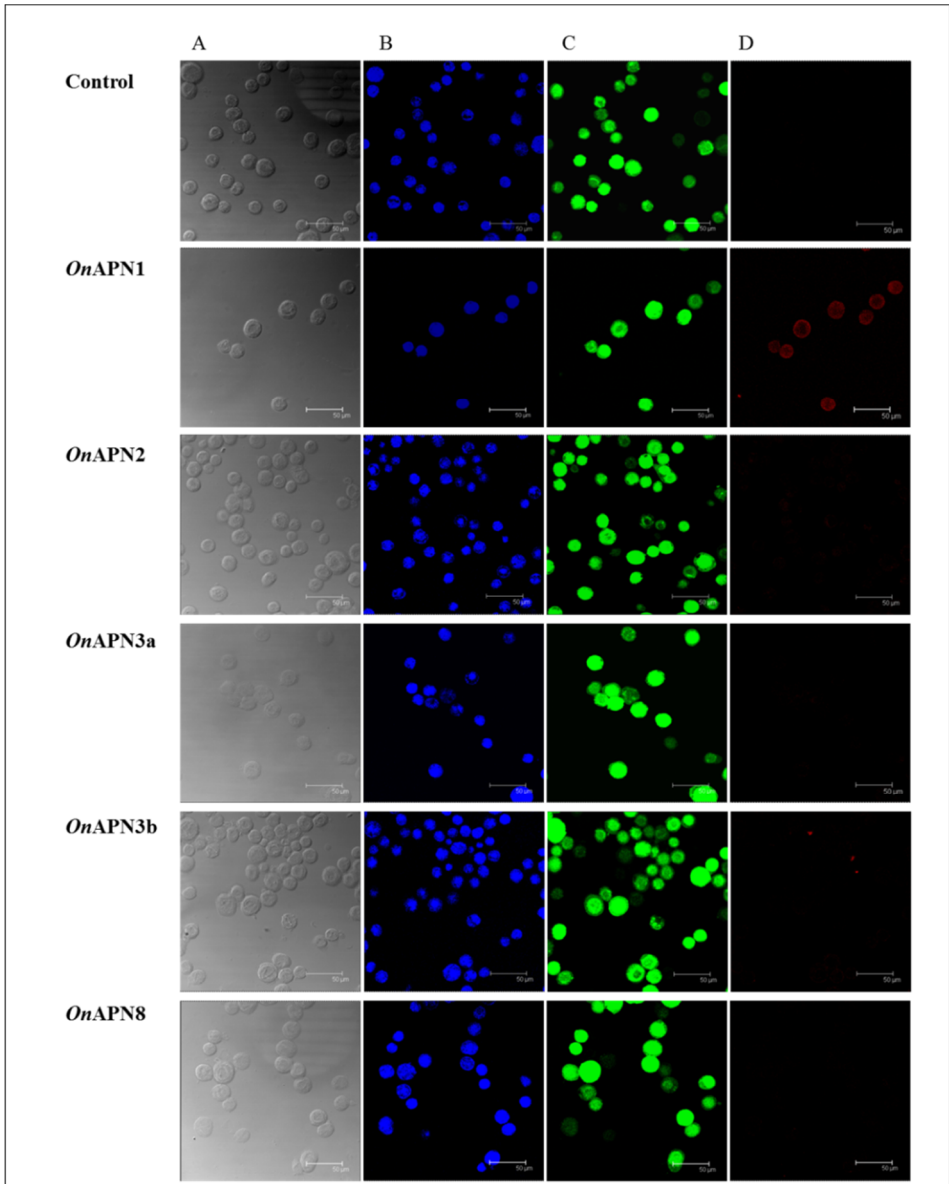


Figura 48. Detección de la unión de la proteína Cry1Ab a las células Sf21 que expresan las *OnAPN*, detectada por inmunotinción. A) Imagen en microscopia de contraste de fase; B) Detección del colorante de ácidos nucleicos DAPI; C) Detección de la expresión de GFP; D) Detección de rodamina. La barra de escala de cada imagen corresponde a 50 μ m.

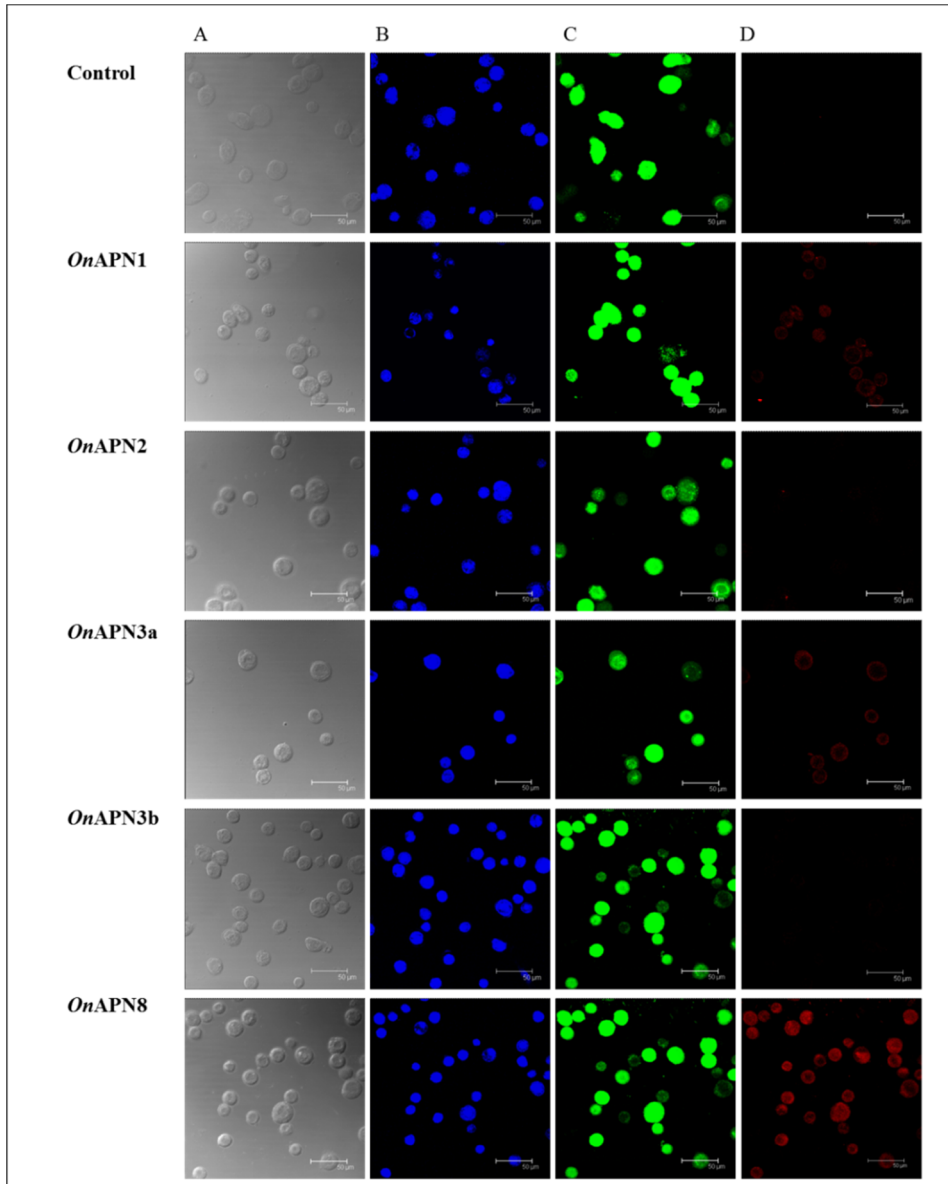


Figura 49. Detección de la unión de la proteína Cry1F a las células Sf21 que expresan las *OnAPN*, detectada por inmunotinción. A) Imagen en microscopía de contraste de fase; B) Detección del colorante de ácidos nucleicos DAPI; C) Detección de la expresión de GFP; D) Detección de rodamina. La barra de escala de cada imagen corresponde a 50 µm.

4.4.2 Ensayos de citotoxicidad con las proteínas Cry

Las células Sf21 que expresan únicamente la proteína GFP no mostraron un aumento de mortalidad (citotoxicidad evidenciada por un aumento de la actividad

ldh liberada al medio de cultivo) cuando se incubaron con una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de las proteínas Cry1Ab o Cry1F (Figura 50). Por tanto, se utilizaron para evaluar si la expresión de las *OnAPN* era suficiente para convertir las células sensibles a dichas toxinas. Los resultados obtenidos mostraron que la incubación de las células Sf21 que expresaban las distintas *OnAPN* con la proteína Cry1Ab no provocó en ningún caso un aumento de la citotoxicidad, comparando los valores de mortalidad celular con aquellos obtenidos tras incubación con PBS (Figura 50A). Estos datos sugieren que la expresión de la proteína *OnAPN1* en la superficie de la célula y su unión a la toxina Cry1Ab no es un motivo suficiente para causar citotoxicidad en células Sf21.

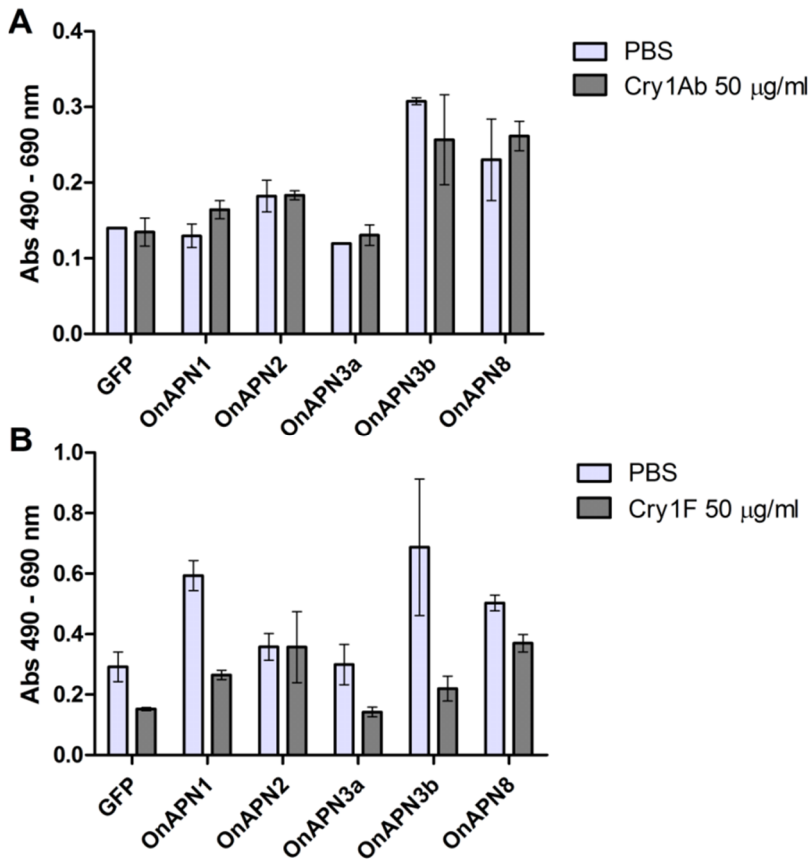


Figura 50. Cuantificación de la actividad LDH liberada por células Sf21 que expresan las *OnAPN* tras incubación con proteínas Cry. A) Incubación con proteína Cry1Ab, B) Incubación con la proteína Cry1F. La barra vertical representa le media de dos ensayos independientes \pm SE.

La incubación de las células que expresan las distintas *OnAPN* con la proteína Cry1F tampoco mostró la existencia de un efecto citotóxico específico

asociado a la expresión de alguna de las *OnAPN* en particular (Figura 50b). La unión de la proteína Cry1F a las *OnAPN1*, *OnAPN3a* y *OnAPN8* no solo no aumentó la susceptibilidad de las células Sf21 sino que, paradójicamente, la incubación control con PBS causó una mortalidad más alta que la incubación con la toxina. Estos resultados sugieren que también para la Cry1F, su unión con una *OnAPN* expresada en la superficie celular no es bastante para generar muerte celular en las células Sf21.

4.5 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE *onapn1* Y *onapn2* MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA

El silenciamiento *in vivo* de los genes *onapn1* y *onapn2* se probó mediante dos diferentes protocolos: la inyección de ARNcd producido *in vitro* en la cavidad hemocélica de larvas de quinto estadio y el suministro por vía oral de ARNcd producido por bacterias a larvas de tercer estadio.

En el primer protocolo, el ARNcd específico para *onapn1* se produjo *in vitro* con un kit comercial, obteniendo 200 μ l de ARNcd (Figura 51) a una concentración de 0,6 μ g/ μ l (rendimiento total 120 μ g), lo cual nos permitió inyectar 5 μ g de ARNcd a 14 larvas. Después del tratamiento, dos de las larvas inyectadas con ARNcd específico contra *onapn1* murieron, por lo que cuantificamos los niveles de expresión en los 12 individuos supervivientes.

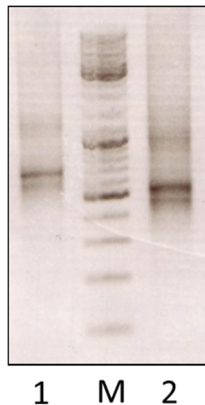


Figura 51. ARNcd obtenido por transcripción *in vitro*. 1) ARNcd específico contra *onapn1*; M) Marcador de peso molecular; las bandas más abundante corresponden 500 bp, 1 y 3 kpb, 3) ARNcd inespecífico.

Los niveles de expresión del gen *onapn1* en el intestino de las larvas inyectadas con su ARNcd específico no fueron diferentes de los niveles de

expresión medidos en los individuos control (inyectados con ARNdc no específico), indicando la falta de un efecto de silenciamiento de forma sistémica. Se observó una alta variabilidad en la expresión del gen *onapn1* tanto en las larvas inyectadas con ARNdc específico como en las larvas inyectadas con ARNdc control (Figura 52).

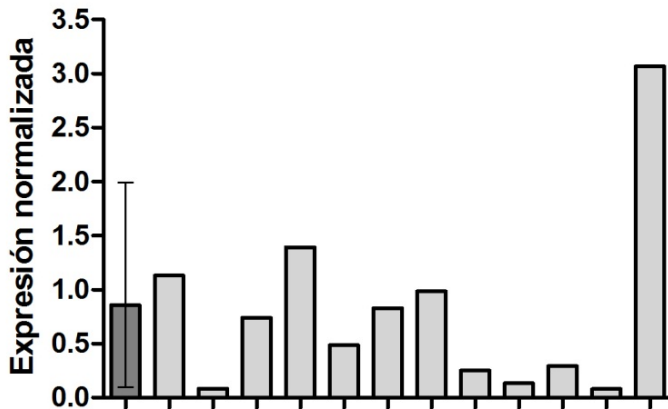


Figura 52. Expresión de *onapn1* detectada por qRT-PCR y normalizada respecto a la expresión del gen de referencia *s3*. Cada columna gris claro representa el nivel de expresión de cada una de las larvas inyectadas con ARNdc específico contra *onapn1*. La columna gris oscuro representa la media (y la barra de error el rango) de los niveles de expresión de *onapn1* detectados en las larvas control (tratadas con ARNdc no específico).

Alternativamente, a larvas de 14 días de edad se les suministró por vía oral ARNdc producido por fermentación bacteriana. Este método permitió la obtención de una solución de ARNdc muy concentrada, ya que a partir de un cultivo de 50 ml se llegó a obtener 50 μ l de ARNdc a una concentración de 6 μ g/ μ l (rendimiento total 300 μ g de ARNdc) (Figura 53A). El método utilizado preveía la purificación del ARNdc a partir del ARN total del cultivo bacteriano, y la degradación selectiva del ARN de cadena sencilla de la bacteria utilizando el enzima RNasa A. Como se puede apreciar en la Figura 53B, la incubación del ARN total con RNasa A (0,1 μ g/ μ l) en una solución de baja concentración salina produjo la degradación de todo el ARN presente en la muestra. La misma incubación en una solución de alta concentración salina produjo la degradación selectiva de las bandas de ARN de cadena sencilla, mientras que las bandas de ARNdc de ~ 500 pb, presentes en ambas muestras, se mantuvieron intactas tras la digestión.

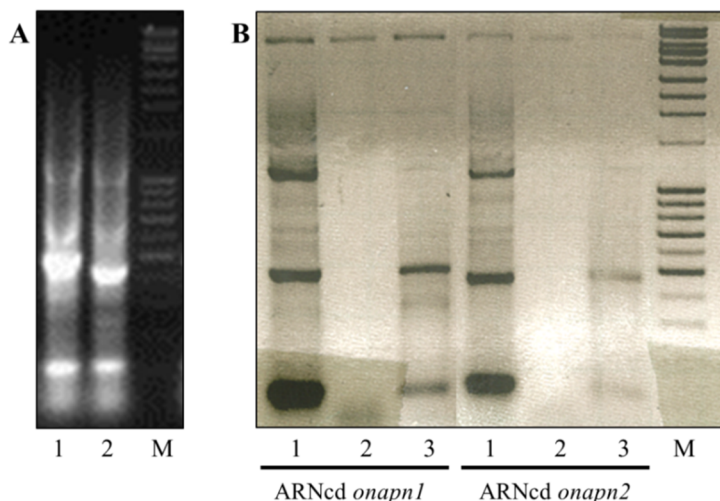


Figura 53. ARNcd obtenido por fermentación bacteriana. A) ARNcd purificado y suministrado por vía oral a larvas de *O. nubilalis*; 1) ARNcd específico contra *onapn1*; 2) ARNcd específico contra *onapn2*. B) Incubación del ARN total purificado a partir de bacterias inducidas que expresaban ARNcd específico contra *onapn1* u *onapn2* con RNasa A. 1: ARN total sin incubar. 2: ARN total incubado con RNasa A en una solución de baja concentración salina. 3: ARN total incubado con RNasa A en una solución de alta concentración salina. M: marcador de peso molecular.

Se realizaron tres ensayos de suministro de ARNcd por vía oral proporcionando a cada larva: a) una gota con 60 ng de ARNcd, b) dos gotas con 600 ng de ARNcd, c) una gota con 600 ng de ARNcd previamente incubado con el vector lipídico Celfectina. En general, los niveles de los transcritos de *onapn1* y *onapn2*, cuantificados por qRT-PCR a las 72 horas tras la ingestión, resultaron similares a los obtenidos en las larvas control. En el caso del suministro de ARNcd específico contra *onapn1*, no detectamos ningún individuo con una expresión del transcrito inferior a los niveles de expresión de las larvas control o de las tratadas con ARNcd no específico, en ninguno de los ensayos realizados (Figura 54).

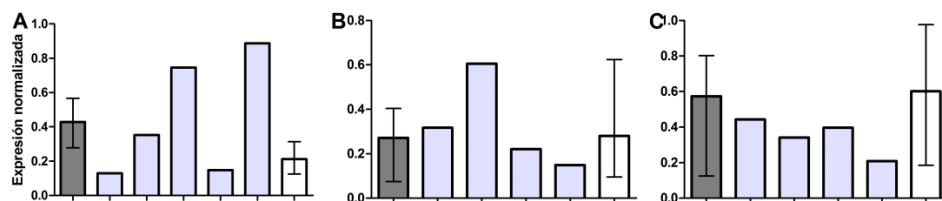


Figura 54. Expresión del gen *onapn1* cuantificada por qRT-PCR y normalizada respecto al gen de referencia *s3*. Las columnas gris oscuro y blancas representan respectivamente el promedio de la expresión en las larvas control y en las larvas tratadas con ARNcd inespecífico (contra *onapn2*). Las barras de error representan el rango de la expresión dentro de cada grupo. Las columnas gris claro representan la expresión individual en larvas a las cuales se suministró ARNcd específico contra *onapn1*. A) 60 ng ARNcd; B) 1,2 μ g ARNcd; C) 600 ng ARNcd pre-incubado con Celfectina.

Con el suministro de 1,2 μ g de ARNcd específico contra *onapn2* logramos encontrar dos individuos cuya expresión del gen *onapn2* resultaba inferior tanto a los niveles de expresión en las larvas control como en las larvas tratadas con ARNcd no específico (Figuras 55B). Por el contrario, bien el suministro de 60 ng de ARNcd o bien el suministro de 600 ng del mismo ARNcd preincubado con Celfectina no provocaron ningún efecto específico (Figura 55).

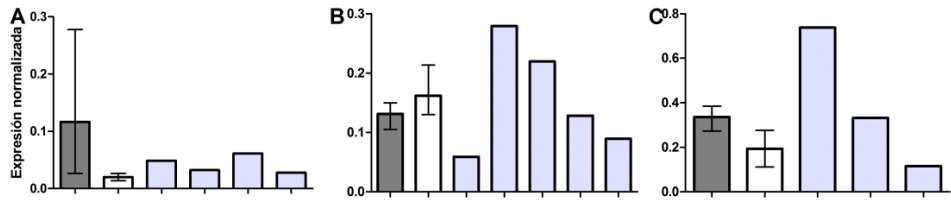


Figura 55. Expresión del gen *onapn2* cuantificada por qRT-PCR y normalizada respecto al gen de referencia *s3*. Las columnas gris oscuras y las blancas representan respectivamente el promedio de la expresión en las larvas control y en las larvas tratadas con ARNcd inespecífico (contra *onapn1*). Las barras de error representan el rango de la expresión dentro de cada grupo. Las columnas gris claro representan la expresión individual en larvas a las cuales se suministró ARNcd específico contra *onapn2*. A) 60 ng ARNcd; B) 1,2 μ g ARNcd; C) 600 ng ARNcd pre-incubado con Celfectina.

La falta de una inhibición clara de la expresión de los transcritos diana hubiera podido depender de que las larvas no ingirieran correctamente las gotas de ARNcd o que la cantidad suministrada no fuera suficiente, por lo que alimentamos las larvas durante seis días con bacterias frescas, inducidas para la expresión de ARNcd específico contra *onapn1* u *onapn2*. En ambos ensayos encontramos individuos que tenían niveles de transcrito inferiores a los de las larvas control (Figura 56). Sin embargo, encontramos también individuos con niveles de expresión reducidos en las larvas tratadas con ARNcd no específico, indicando que el posible efecto de inhibición de la expresión parecía ser inespecífico.

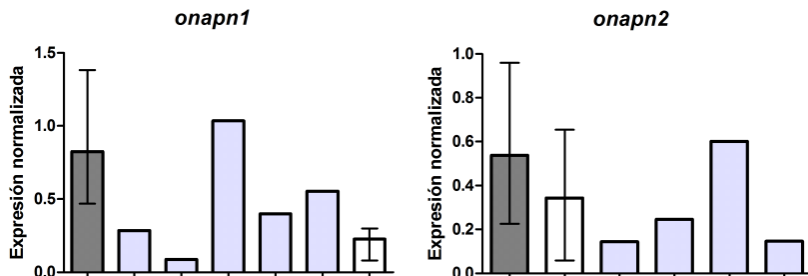


Figura 56. Expresión de los genes *onapn1* y *onapn2* cuantificada por qRT-PCR y normalizada respecto al gen de referencia *s3*. Las columnas gris oscuras y las blancas representan respectivamente el promedio de la expresión en las larvas control y en las larvas alimentadas con bacterias que expresaban ARNcd inespecífico. Las barras de error representan el rango de la expresión dentro de cada grupo. Las columnas gris claro representan la expresión individual en larvas a las cuales se suministraron bacterias que expresaban ARNcd específico.



DISCUSIÓN

5.1 ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE RESISTENCIA A LAS PROTEÍNAS Cry EN *O. nubilalis*

5.1.1 Análisis de la susceptibilidad basal de una colonia de campo y selección de resistencia a la proteína CryAb

La susceptibilidad de poblaciones de campo de *O. nubilalis* frente a las toxinas Cry producidas por *B. thuringiensis* es un tema de gran relevancia, especialmente desde la introducción del maíz Bt que controla de manera tan eficaz esta plaga. Numerosos estudios han determinado la susceptibilidad de poblaciones de campo a formulados comerciales basados en *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, así como a las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac purificadas, tanto en insectos recolectados en los campos de EEUU (Siegfried *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1997; Marçon *et al.*, 1999) como de Europa (González-Nuñez *et al.*, 2000; Manachini y Lozzia, 2003; Farinós *et al.*, 2004; Saeglitz *et al.*, 2006). Debido a la escasa utilización de formulados Bt para el control de esta plaga (Meissle *et al.*, 2010), nuestro trabajo de investigación es el primero en el que se compara la toxicidad de cuatro proteínas individuales de *B. thuringiensis* y del producto estándar HD-1-S-2005 en una población silvestre de *O. nubilalis*, procedente de un invernadero repetidamente pulverizado con formulados Bt (colonia PH) y en una población estándar de laboratorio (colonia LAB).

Los fallos en el control de *O. nubilalis* descritos por los agricultores responsables de los invernaderos, nos hicieron sospechar la ocurrencia de dos posibles escenarios: el desarrollo de un foco de resistencia a los formulados Bt utilizados o que las larvas de *O. nubilalis* simplemente lograran evitar las superficies vegetales tratadas. En la literatura se han descrito dos casos de poblaciones de campo que desarrollaron resistencia a productos Bt (revisados en Ferré *et al.*, 2008): *P. xylostella* y *T. ni*. En particular, la resistencia de *T. ni* al producto Dipel ES apareció después de repetidos tratamientos con formulados Bt en invernaderos (Janmaat y Myers, 2003), el mismo ambiente cerrado en el que apareció la infestación de *O. nubilalis*. Por otro lado, el comportamiento de las larvas de *O. nubilalis*, que unos días tras la eclosión escavan galerías en el tallo de la planta de donde emergerán solo como adultos, podría haber evitado la exposición de las larvas a los formulados Bt utilizados para su control. Solo el estudio de la susceptibilidad a las proteínas Cry de la población que infestaba los invernaderos tratados con formulados Bt podría ayudar a determinar las causas reales del fallo en el control.

La causa de la resistencia de una cepa de *O. nubilalis* seleccionada con formulados Dipel ES (Huang *et al.*, 1997) fue descrita como debida a fallos en la activación de las protoxinas por parte del jugo intestinal de las larvas (Li *et al.*, 2004b). Por esta razón, en nuestro estudio incluimos la caracterización de la susceptibilidad de la población de invernadero PH tanto a protoxinas Cry (la forma en la cual las proteínas Cry están presentes en los formulados Bt) como a las toxinas activadas (la forma en la cual el insecto las ingiere cuando se alimenta de maíz Bt).

En general, los resultados de la susceptibilidad de las colonias PH y LAB concuerdan con la mayoría de los estudios realizados con *O. nubilalis* que indican que la proteína más tóxica para el taladro del maíz es la toxina Cry1Ac, seguida por otras dos proteínas de la misma clase: Cry1Ab y Cry1Aa, mientras que la proteína Cry2Aa ejerce un efecto tóxico menor (Chambers *et al.*, 1991; Marçon *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2011). Los resultados de los bioensayos de mortalidad, tanto con las protoxinas como con las proteínas Cry activadas, mostraron que la colonia PH era menos susceptible que la colonia de laboratorio LAB a todas las proteínas de la clase Cry1A (las proteínas más tóxicas para *O. nubilalis*). Por el contrario, la forma activada de la proteína Cry2Aa fue la única que resultó menos tóxica para la colonia LAB. Las diferencias en susceptibilidad entre las dos colonias a las proteínas de la clase Cry1A fueron ligeramente mayores en el caso de las protoxinas (entre 4 y 6 veces de diferencia) que en el de las toxinas (entre 2 y 5 veces). La existencia de variabilidad intrapoblacional, aunque pueda parecer pequeña, como la observada en este trabajo, puede resultar importante bajo el punto de vista de las aplicaciones de formulados Bt en campo. El discernir si los niveles de variabilidad detectados entre las colonias PH y LAB podrían debidos a la presión de selección ejercitada por las repetidas aplicaciones de formulados Bt en el invernadero, o simplemente ser reflejo de la variabilidad en la tolerancia propia de este lepidóptero, se ha basado en los motivos que enumeramos a continuación.

En primer lugar, se han descrito en la bibliografía variaciones en la susceptibilidad basal a la proteína Cry1Ab comparables con nuestros resultados en poblaciones geográficamente distantes de *O. nubilalis* que no habían sufrido exposiciones previas a *B. thuringiensis*. Un estudio con poblaciones estadounidenses mostró una variabilidad de hasta 6 veces a la protoxina Cry1Ab a nivel de CL₅₀ (Siegfried *et al.*, 1995), y el mismo rango de variación fue evidenciado en otro estudio con poblaciones españolas (Farinós *et al.*, 2004). Sin embargo, posteriores estudios con poblaciones europeas describieron que la variación interpoblacional en la susceptibilidad a la proteína Cry1Ab podía considerarse

mínima (González-Nuñez *et al.*, 2000; Saeglitz *et al.*, 2006), y otros autores que compararon la susceptibilidad de cinco poblaciones de campo al producto comercial Dipel ES, obtuvieron una variación entre ellas de 1,9 veces (Huang *et al.*, 1997). Bajo este punto de vista, a pesar de que parezca existir una variabilidad interpoblacional en la susceptibilidad de *O. nubilalis* a las proteínas insecticidas Cry, ésta parece ser muy limitada. Para otras especies de lepidópteros, la literatura describe casos en que la variación interpoblacional puede superar las cien veces (Ferré y Van Rie, 2002; Monnerat *et al.*, 2006), un fenómeno que no se puede considerar común en *O. nubilalis*. Diferencias interpoblacionales limitadas en la susceptibilidad a las proteínas Cry parecen ser comunes a especies pertenecientes a la misma familia del taladro del maíz, en las cuales las variaciones en la susceptibilidad difícilmente superan las 10 veces (Trisyono y Chippendale, 2002; Meng *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005; Jalali *et al.*, 2010). Con toda esta información en la mano, parece extremadamente difícil determinar si las diferencias que observamos entre las colonias en estudio fueron el resultado de la presión de selección presente en el invernadero o solamente una consecuencia de la variabilidad natural descrita entre poblaciones de *O. nubilalis*.

En segundo lugar, no se encontró ninguna diferencia entre la susceptibilidad de las dos poblaciones al producto estándar HD-1-S-2005, apoyando la hipótesis que las diferencias observadas en los bioensayos con las proteínas Cry individuales probablemente no eran debidas a cambios genéticos que hubieran favorecido la evolución de la resistencia en los invernaderos tratados con los productos Bt.

En tercer lugar, los resultados de los dos ensayos de selección indicaron que la colonia PH carecía de la variabilidad necesaria en los genes de resistencia para responder a una selección de laboratorio con altas concentraciones de proteína Cry1Ab. Otros ensayos de selección de resistencia en laboratorio con poblaciones de *O. nubilalis* procedentes de diferentes partes del mundo han mostrado que esta plaga es capaz de responder a la selección con la proteína Cry1Ab (Siqueira *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2009) o con formulados Bt comerciales (Huang *et al.*, 1997), desarrollando alto niveles de resistencia. Pero, a pesar de los numerosos éxitos en la selección de colonias resistentes es muy improbable que todos estos resultados reflejen los mecanismos de resistencia que realmente pueden surgir en campo, ya que ninguna de las colonias de *O. nubilalis* seleccionadas en laboratorio ha sido capaz de desarrollarse sobre el maíz Bt que expresa una alta dosis de proteína Cry1Ab (Huang *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2009). Debido a

que en campo las larvas son expuestas a altos niveles de proteínas Cry producidas por las plantas Bt durante toda la temporada de cultivo, en nuestros ensayos de selección intentamos simular parte de lo que ocurre en campo y alimentamos las larvas con dieta intoxicada con la proteína Cry1Ab durante un mes sin interrupciones, en lugar de escoger en cada generación las larvas sobrevivientes tras un bioensayo de siete días (Huang *et al.*, 1997; Farinós *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2009). La presencia constante de la toxina en la dieta dio lugar a una fuerte ralentización del desarrollo larvario de ambas poblaciones seleccionadas respecto a la población control (datos no mostrados) y en el caso del ensayo de selección 10x la población colapsó en la segunda generación. Esto sugiere que entre las larvas fundadoras de la colonia PH no estaban presentes individuos altamente resistentes a la proteína Cry1Ab. Nuestros resultados concuerdan con numerosos estudios realizados tanto en EEUU como en Europa, para determinar la frecuencia de los alelos de resistencia a la proteína Cry1Ab (necesarios para sobrevivir a la alta dosis de toxina Cry1Ab expresada por el maíz Bt) en poblaciones de campo del taladro del maíz, que han indicado que esta frecuencia es muy baja ya que ningún alelo mayor de resistencia ha sido detectado hasta ahora (Andow y Alstad, 1998; Andow *et al.*, 2000; Bourguet *et al.*, 2003; Stodola *et al.*, 2006; Engels *et al.*, 2010; Siegfried y Hellmich, 2012). Por otro lado, estos rastreos identificaron otros alelos que permitieron a ciertos insectos de sobrevivir hasta el segundo estadio larvario sobre maíz Bt derivado del evento Bt11, y que se definieron como alelos parciales de resistencia (Andow *et al.*, 2000). La presencia de un alelo parcial de resistencia parece ser una característica común a poblaciones silvestres de *O. nubilalis* ya que su frecuencia en una población de Iowa se calculó como $3,9 \times 10^{-3}$ (Andow *et al.*, 2000) y evidencias de la presencia de alelos parciales de resistencia se encontraron también durante el rastreo “F₂ screen” de poblaciones de campo francesas y americanas (Bourguet *et al.*, 2003). Los resultados que obtuvimos en el ensayo de selección 1x mostraron un nivel de resistencia comprendido entre cinco y nueve veces en las generaciones F₃ – F₉ hasta que la población seleccionada colapsó tras aumentar la concentración de proteína Cry1Ab en la dieta (que llegó a ser la misma concentración utilizada en el ensayo 10x). La presencia de diferentes genes menores (alelos parciales) de resistencia en la colonia PH que actúan de forma aditiva podría explicar la respuesta moderada que obtuvimos en la primera parte del ensayo de selección 1x y el colapso de la colonia cuando se expuso a una dosis mayor de toxina durante un tiempo prolongado. Resultados parecidos a estos fueron obtenidos por Farinós *et al.* (2004) en la selección de una colonia de *O. nubilalis* con la proteína Cry1Ab que mostró un nivel de resistencia en la generación F₈ diez veces mayor respecto al control. En otro estudio, se seleccionaron colonias resistentes

fundadas con insectos procedentes de Italia, Nebraska y una combinación de Francia y Suiza, las cuales resultaron en niveles de resistencia moderados (entre 14 y 32 veces) que se obtuvieron en las primeras generaciones (entre F₇ y F₉) pero que fluctuaron durante todo el periodo de tiempo que duró el ensayo a pesar de que la presión de selección no disminuyera (Chaufaux *et al.*, 2001). Estos hechos parecen indicar que ciertos niveles de tolerancia están comúnmente distribuidos entre poblaciones europeas y estadounidenses de *O. nubilalis* y que esta plaga no parece necesitar de un alelo mayor de resistencia para responder de forma moderada a la presión de selección ejercida por las proteínas de *B. thuringiensis*, aunque la resistencia que se puede seleccionar en este caso no parece constituir una amenaza para la eficacia de las plantas Bt.

En cuarto lugar, los datos de mortalidad funcional (que no evidenciaron diferencias entre las dos colonias PH y LAB) apoyan la hipótesis de que no se seleccionó resistencia en el invernadero tratado con formulados Bt. La exposición de las larvas de *O. nubilalis* a las proteínas Cry generalmente causa un retraso en el desarrollo larvario y por esa razón medimos la mortalidad funcional. Este es un criterio que une la mortalidad en sentido estricto con la inhibición severa del crecimiento y que fue introducido en 1999 para *O. nubilalis*, (Marçon *et al.*) para ensayar la susceptibilidad basal de poblaciones estadounidenses. Desde entonces ha sido utilizado en otros estudios realizados por el mismo grupo (Siegfried *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2011). La comparación de los valores de mortalidad funcional no evidenció ninguna diferencia adicional en la susceptibilidad entre las colonias PH y LAB y solo confirmó que la toxina Cry2Aa (la menos activa frente a *O. nubilalis*) era menos tóxica para las larvas de la colonia FRA (como ya se había evidenciado en los ensayos de mortalidad). Por todas estas razones, consideramos que los fallos en el control de la infestación de *O. nubilalis* en el invernadero con cultivo de pimiento, podrían haber sido principalmente debidos al carácter taladrador de las larvas de este insecto, que penetrando al interior del tallo pueden evitar el efecto tóxico de los preparados Bt, más que a un cambio genético heredable relacionado con la resistencia a las proteínas Cry.

La comparación de la susceptibilidad basal obtenida en bioensayos realizados con el mismo método pero con diferentes fuentes de toxina no es aconsejable. En nuestro caso, los resultados de mortalidad con las larvas de la población LAB obtenidos con la proteína Cry1Aa activada, producida por dos clones distintos, mostraron una diferencia en toxicidad de 10 veces y de 8 veces en el ensayo de mortalidad funcional. En la literatura, hay descritos numerosos

ejemplos en los cuales se ha empleado el mismo tipo de toxina, procedente de dos fuentes distintas, resultando en diferentes porcentajes de mortalidad. Saeglitz *et al.* (2006), en un estudio con *O. nubilalis* observaron una diferencia en toxicidad dependiente de la procedencia de la proteína Cry1Ab de 8 veces utilizando el método de bioensayo de contaminación en superficie y de 7 a 16 veces utilizando la técnica de la incorporación en dieta. Los datos de susceptibilidad en poblaciones españolas de *O. nubilalis* y *S. nonagroides* publicados por Farinós y colaboradores (2004) fueron obtenidos con una preparación de proteína Cry1Ab diferente (aunque procedente de la misma fuente) y mucho más tóxica de aquella utilizada por el mismo grupo en los ensayos de mortalidad realizados en el 2000 (González-Nuñez *et al.*) que hizo imposible la comparación entre los dos estudios, a pesar de que los ensayos se realizaron de la misma forma y en el mismo laboratorio. Estos datos, juntos con los de nuestro estudio, indican que es prácticamente imposible comparar bioensayos realizados con diferentes fuentes de proteínas Cry, ya que la diferencia en toxicidad podría ser equivocadamente interpretada como un cambio en la susceptibilidad basal de la población.

5.1.2 Análisis genético cuantitativo de la tolerancia a la proteína Cry1Ab

La resistencia a la proteína Cry1Ab en tres poblaciones de laboratorio de *O. nubilalis* ha sido descrita como incompletamente recesiva y controlada por más que un *locus* (Alves *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2009), mientras que en la mayoría de lepidópteros la resistencia a las proteínas Cry ha sido descrita como un carácter monogénico (Ferré y Van Rie, 2002). Además, existe una variación poblacional significativa, aunque pequeña, en la susceptibilidad a la proteína Cry1Ab entre poblaciones de *O. nubilalis*, como la que ha sido detectada en el presente trabajo y en otros estudios (Marçon *et al.*, 1999; Siegfried *et al.*, 2001; Farinós *et al.*, 2004). Estos hechos, nos sugirieron que la variación en la tolerancia (definida como una medida cuantitativa de la resistencia distribuida normalmente entre los individuos de una población, Finney, 1971) a la proteína Cry1Ab podría ser estudiada bajo un punto de vista genético como un rasgo cuantitativo. Para investigar tal hipótesis, utilizamos un diseño experimental basado en la creación de isolíneas seleccionadas con la proteína Cry1Ab y fundadas con parejas individuales de adultos pertenecientes a dos poblaciones procedentes de campos españoles. La variabilidad fenotípica continua que observamos en la susceptibilidad a la proteína Cry en la generación F₁ junto a la disminución, tras selección, de la heterogeneidad en la generación F₂ apoyaron la hipótesis de que parte de la variabilidad en la tolerancia a la proteína Cry1Ab observada en las muestras poblacionales en estudio, tenía una

base genética poligénica. Tabashnik y Cushing (1989) describieron que la variación en la tolerancia determinada por una herencia poligénica sigue una distribución normal dentro de una población y es esencialmente continua, resultando en un amplio abanico de respuestas como las que observamos en el cribado de la generación F₁.

La estimación del límite mayor para la heredabilidad (h^2) de la tolerancia a la proteína Cry1Ab, calculada utilizando dos métodos diferentes, se situó entre 0,82 y 0,90. Estos dos valores, que resultaron ser muy similares, indican que en la variación del fenotipo de la tolerancia a la proteína Cry1Ab en *O. nubilalis* existe una fuerte componente debida a la variación genética aditiva, y consecuentemente, sugieren la existencia de un potencial para la evolución de la resistencia a esta toxina en las poblaciones de *O. nubilalis* en estudio. Estas estimaciones representan solamente el límite superior de la proporción de la varianza total que se debe a la varianza genética aditiva. Esto porque el método de cruces utilizado (isolíneas de hermanos completos) puede introducir en la estimación de la heredabilidad errores debidos a la dominancia y al ambiente común de cría (Falconer y Mackay, 1996). Sin embargo, Tabashnik y Cushing (1989) calcularon que la sobrestimación introducida por el uso de familias de hermanos completos normalmente es menor del 10%. El valor de h^2 obtenido en nuestro estudio es bastante elevado aunque cae a dentro del límite máximo de unos valores de h^2 estimados para la resistencia a insecticidas y revisados por Omer y colaboradores (1993). En estudios de resistencia a las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* en lepidópteros, una estima relativamente alta de la h^2 (<0,52) para la tolerancia a la proteína Cry1Ab fue encontrada en una pequeña muestra poblacional de *C. suppressalis* en las Filipinas (Alinia *et al.*, 2000). Tabashnik obtuvo valores de heredabilidad realizada para la resistencia (calculada utilizando la respuesta a la presión de selección) a formulados Bt en *P. interpunctella* que oscilaban de 0,22 hasta 0,61 en 11 experimentos, mientras que en otras seis especies de lepidópteros, los valores obtenidos estaban comprendidos entre 0,04 y 0,2 (Tabashnik, 1994). En *O. nubilalis* la estima de la heredabilidad realizada para la resistencia a Dipel ES en cinco colonias diferentes procedentes de campo osciló de 0,17 a 0,46 en la primera parte de la selección hasta disminuir a un rango entre 0 y 0,08 en la segunda parte, hecho que los autores asociaron con la obtención de una resistencia homogénea (Huang *et al.*, 1999b). Es importante tener en cuenta que cuando se comparan estimas de h^2 con estimas obtenidas como heredabilidad realizada, con este último método a menudo se tiende a infravalorar la heredabilidad en la población de base (Falconer y Mackay, 1996).

La estima de la heredabilidad siempre es relativa y está influenciada por los factores genéticos y medioambientales de la población en estudio y nunca se puede interpretar como una medida absoluta de la contribución genética a la variación de un fenotipo (Firko y Hayes, 1990; Falconer y Mackay, 1996). Por esta razón, las predicciones basadas en las estimaciones de la heredabilidad tienen que estar fuertemente ponderadas. Si las poblaciones silvestres de *O. nubilalis* mostraran una heredabilidad tan alta bajo condiciones de campo como la calculada en nuestro estudio, entonces la evolución de la resistencia podría representar una seria amenaza para los productos Bt utilizados para el control del taladro del maíz (como el maíz Bt). La estrategia de la “alta dosis – refugio” actualmente utilizada en el manejo de la resistencia a las plantas Bt asume que el rasgo genético de la resistencia es funcionalmente recesivo a la alta concentración de toxina que expresan las plantas, haciendo que la heredabilidad y la dominancia del rasgo disminuyan respecto al empleo de una dosis de toxina más baja, retrasando así la aparición de la resistencia (Tabashnik *et al.*, 2004). Este tipo de aproximación se ha revelado altamente efectivo para el manejo de la resistencia en *O. nubilalis* ya que no se ha detectado ningún caso de aparición de resistencia en campo, a pesar de que el maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab se viene cultivando desde el año 1996 (Farinós *et al.*, 2004; Siegfried and Hellmich., 2012).

En nuestro estudio, encontramos que el 9% de las isolíneas (cribadas con una dosis de Cry1Ab capaz de causar una mortalidad general del 87%) tuvo un alto porcentaje de supervivencia al tratamiento (mayor del 60%). Este hecho indica que el rasgo de la tolerancia a la proteína Cry1Ab está comúnmente distribuido en las poblaciones españolas estudiadas. Como discutimos en el apartado anterior, otros autores han descrito la presencia de forma común de alelos parciales de resistencia en poblaciones de Francia y EEUU (Andow *et al.*, 2000; Bourguet *et al.*, 2003). El efecto aditivo de estos alelos parciales en *O. nubilalis*, junto a factores medioambientales, podría ser la causa de la variación continua del fenotipo de la tolerancia, tal y como detectamos en este trabajo. Bajo este punto de vista, la presencia común de alelos parciales de la resistencia podría favorecer la aparición de una resistencia poligénica bajo condiciones de laboratorio, como los resultados descritos por Alves y colaboradores (2006) o Crespo *et al.* (2009). Por otro lado, en una situación real de campo, la alta dosis de proteína Cry1Ab expresada por el maíz Bt solamente podría ser sobrellevada por otro tipo de resistencia, de carácter monogénico y cuyos alelos, a tenor de los estudios realizados hasta el día de hoy, deben de ser efectivamente raros (Siegfried y Hellmich, 2012). Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que hasta ahora ninguna colonia de *O. nubilalis*

seleccionada en laboratorio con la proteína Cry1Ab ha podido desarrollarse normalmente sobre maíz el Bt (Siqueira *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2009). La relativa alta frecuencia de los alelos de tolerancia en las poblaciones silvestres de *O. nubilalis* tendría que tenerse bien en cuenta para evitar la detección de falsos casos de resistencia surgida en campo. Sería también muy interesante investigar si estos alelos parciales de resistencia pueden interactuar con los alelos mayores de resistencia (cuando estos aparezcan), acelerando así la aparición de insectos resistentes (Alstad y Andow, 1996).

La estimación del número mínimo de factores segregantes (Lande, 1981) sugirió que el número de *loci* que influenciaban la tolerancia a la proteína Cry1Ab en las poblaciones en análisis en este trabajo era de dos. Estudios previos con colonias de *O. nubilalis* resistentes a Cry1Ab, estimaron (utilizando tanto el método de Lande como otros test indirectos) que el número de *loci* involucrados en la resistencia a la proteína Cry1Ab iba de 2,6 hasta 5 en el caso de la colonia resistente SKY (Crespo *et al.*, 2009), mientras que en el caso de las colonias resistentes Europe-R y RSST-R era mayor de 10 (Alves *et al.*, 2006). Sin embargo, todos estos tipos de análisis aportan solamente evidencias indirectas de la contribución aditiva de un número múltiple de *loci* al fenotipo de la tolerancia o de la resistencia. Solamente análisis de ligamiento entre la tolerancia y los diferentes *loci* podrían confirmar directamente la herencia poligénica de este rasgo. Sin embargo, a día de hoy, ningún gen ha sido genéticamente asociado con la resistencia a las proteínas Cry en *O. nubilalis*.

El gen de la caderina ha sido estudiado extensivamente por estar ligado a la resistencia en algunas colonias de lepidópteros seleccionadas en laboratorio, como en el caso de *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella* and *Helicoverpa armigera* (Gahan *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005). En *O. nubilalis*, un estudio *ex vivo* mostró que la expresión de la caderina del taladro del maíz volvía susceptibles las células Sf9 a la proteína Cry1Ab (Flannagan *et al.*, 2005). Sin embargo, numerosos estudios han intentado clarificar la contribución de la caderina a la resistencia a la proteína Cry1Ab no consiguiendo encontrar ninguna evidencia que demostrase su implicación (Coates *et al.*, 2008b; Khajuria *et al.*, 2009; Bel *et al.*, 2009). En esta tesis, se ha puesto a punto un marcador molecular EPIC-PCR para estudiar la segregación del gen *cdh* en las isóneas tolerantes a la proteína Cry1Ab y evaluar su posible contribución como uno de los factores genéticos aditivos que contribuyen a la tolerancia. Este marcador mostró un patrón aleatorio de inserciones y deleciones, y la heterocigosidad obtenida fue conforme con el

equilibrio de Hardy y Weinberg. Solamente la presencia de un alelo nulo podría haber afectado a su utilidad, sin embargo observamos que este hecho no influyó la segregación Mendeliana del marcador. En las cinco aislíneas estudiadas (que mostraban una tolerancia superior al resto) identificamos seis alelos que difirieron entre ellos por inserciones y deleciones en la zona intrónica, confirmando la alta variabilidad del gen *cdh* de *O. nubilalis* previamente descrita en otros estudios (Coates *et al.*, 2005; Bel *et al.*, 2009). Una de las cinco aislíneas tolerantes mostró diferencias significativas en los ratios genotípicos de *cdh* entre las larvas control y las supervivientes a la exposición a la proteína Cry1Ab, siendo en estas últimas el genotipo CD el predominante. Sin embargo, no se pudo confirmar esta asociación en la generación F₂, porque no se obtuvo progenie viable. La secuenciación del fragmento correspondiente a la TBR descrita por Griko *et al.* (2007) reveló la presencia de cuatro mutaciones en los alelos C y D que llevaban a sustituciones aminoacídicas. Tres de estas sustituciones ya habían sido descritas en un estudio con una población susceptible de *O. nubilalis* (Coates *et al.*, 2005) mientras que la cuarta mutación se describió en una cepa resistente de *O. nubilalis* cuya resistencia no se pudo asociar a mutaciones en la caderina (Bel *et al.*, 2009). Además, los alelos C y D fueron encontrados en las otras aislíneas tolerantes, en las cuales no se encontró una asociación entre la segregación de *cdh* y la tolerancia, aunque nunca juntos formando el genotipo CD. Aunque estos resultados parecen descartar la implicación de los alelos C y D de *cdh* en la tolerancia, su posible contribución no se puede rechazar totalmente ya que no se secuenció el gen completo y podrían existir deleciones en otras zonas de la secuencia codificante que podrían causar resistencia, tal y como se ha descrito en *H. armigera* (Xu *et al.*, 2005).

En conclusión, el análisis de aislíneas fundadas con individuos procedentes de dos poblaciones españolas de campo de *O. nubilalis*, ha revelado la presencia común del rasgo de la tolerancia a la proteína Cry1Ab, el cual parece tener una herencia poligénica. Los estudios de segregación mostraron pocos *loci* involucrados (muy probablemente dos) y que el gen *cdh* podría ser uno de ellos, aunque se necesitan más evidencias para confirmar su implicación y para identificar el resto de los genes responsables de este fenómeno. Los resultados obtenidos en este estudio son especialmente relevantes para el manejo de la resistencia a la proteína Cry1Ab en campo. De hecho, en los seguimientos de la aparición de la resistencia en los campos de maíz Bt, se debería de tener en cuenta la presencia habitual de alelos parciales de resistencia, ya que pueden conferir a los insectos la capacidad de sobrevivir sobre plantas Bt durante un tiempo limitado y esta exposición parcial podría favorecer el desarrollo de la resistencia.

5.2 INTERACCIÓN DE LAS TOXINAS Cry CON PROTEÍNAS DEL EPITELIO INTESTINAL DE *O. nubilalis*

La unión de las proteínas Cry a la membrana epitelial del intestino de las larvas ha sido descrito como un paso fundamental en la toxicidad frente a los lepidópteros (Ferré y Van Rie, 2002). En *O. nubilalis*, diferentes estudios de la unión en solución han descrito la unión específica de la proteína Cry1Ab a un receptor presente en las BBMV que parece ser totalmente compartido con la proteína Cry1Ac (Denolf *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004a). Por el contrario, la proteína Cry1F ha sido utilizada en un solo estudio como competidor heterólogo resultando en la observación de que compite por el mismo sitio de unión de la proteína Cry1Ab solamente a grandes concentraciones, sugiriendo la presencia de al menos dos sitios de unión para ella (Hua *et al.*, 2001). A lado de los resultados de los ensayo de unión en solución, los datos descritos en la literatura (Siqueira *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2008; Crespo *et al.*, 2011) indican que en *O. nubilalis* la proteína Cry1F es incapaz de generar resistencia cruzada a la proteína Cry1Ab sugiriendo la existencia de dos receptores distintos, mientras que la resistencia a la proteína Cry1Ab puede generar niveles bajos (menores de cinco veces) de resistencia cruzada a la Cry1F. Los resultados que obtuvimos en nuestros ensayos de bloqueo parecen apoyar a la hipótesis de la existencia de receptores específicos y de otros compartidos para estas dos toxinas en *O. nubilalis*. La unión de la proteína Cry1F resultó verse afectada tanto por las preincubaciones de las BBMV con la misma toxina sin marcar como con la proteína heteróloga Cry1Ab, indicando la existencia de un receptor compartido entre las dos proteínas. Resultados parecidos a los nuestros se obtuvieron con la técnica SPR (Hua *et al.*, 2001). Tanto con esta técnica como en nuestros ensayos no se observó ninguna inhibición de la unión en la configuración inversa, o sea cuando las BBMV preincubadas con la proteína Cry1F se ensayaron para la unión a la proteína Cry1Ab. El diferente comportamiento de estas dos toxinas se intentó explicar con la existencia de al menos dos sitios de unión para la proteína Cry1F, uno de alta afinidad exclusivo para ella misma y otro de baja afinidad compartido con la proteína Cry1Ab (Hua *et al.*, 2001). Podemos especular que, durante la preincubación de bloqueo, las proteínas Cry se unen de una forma irreversible a los receptores presentes en las BBMV y las proteínas utilizadas en el posterior ensayo de unión no compiten realmente con los bloqueantes desplazándolos, sino que solo pueden unir a los receptores que quedaron libres. Bajo este punto de vista, un receptor responsable de la unión irreversible de la proteína Cry1F sería bloqueado por la proteína Cry1Ab y, al revés, otro receptor irreversible para la proteína Cry1Ab no uniría a la proteína

Cry1F. Sorprendentemente, en nuestros ensayos la preincubación de las BBMV con la proteína Cry1Ab sin marcar no tuvo efecto ninguno sobre la unión de la misma proteína biotinilada. Los resultados obtenidos por SPR mostraron que, al revés, la preincubación de las BBMV con la proteína Cry1Ab pudo inhibir la unión de la misma proteína marcada (Hua *et al.*, 2001). Estas diferencias podrían depender de la sensibilidad de las dos técnicas utilizadas (siendo el ensayo con biotina puramente cualitativo) o de las concentraciones más altas de bloqueante que se pueden utilizar en el ensayo SPR (600-6000 veces respecto a las 100 veces máximas utilizadas en nuestros experimentos). Los resultados obtenidos con las BBMV de *S. frugiperda* en este trabajo indicaron que la falta de bloqueo homólogo de la unión de la proteína Cry1Ab biotinilada bajo nuestras condiciones era algo peculiar de *O. nubilalis*.

Diferentes estudios han demostrado que la unión de la proteína Cry1Ac a receptores presentes en la membrana epitelial del intestino de distintos lepidópteros puede ser inhibida por la presencia del azúcar GalNAc (Knowles *et al.*, 1991; Masson *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997; Estela *et al.*, 2004) mientras que la unión de la proteína Cry1Ab no es sensible a este azúcar (Masson *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997; Estela *et al.*, 2004). Nuestros resultados indican que lo mismo ocurre para la unión de la proteína Cry1Ab al epitelio intestinal de *O. nubilalis* ya que las preincubaciones de las BBMV con GalNAc no tuvieron efecto ninguno sobre la unión de esta toxina. La presencia de GalNAc tampoco afectó la unión de la proteína Cry1F, de lo que no hay referencias previas. Ninguno de los otros azúcares ensayados (GlcNAc, manosa y ácido siálico) mostró un efecto de inhibición sobre la unión de la proteína Cry1Ab mientras que el ácido siálico disminuyó la unión de la proteína Cry1F a las BBMV de *O. nubilalis*. Anteriormente, se observó que la preincubación de las BBMV de *H. armigera* con el ácido siálico podía disminuir la unión de la proteína Cry1Ac (Estela *et al.*, 2004) mientras que no existen experimentos parecidos con la proteína Cry1F. Nuestros resultados en los ensayos de bloqueo con las lectinas fueron coherentes con los datos obtenidos empleando los azúcares aunque no pudimos ensayar ninguna lectina específica para el reconocimiento del ácido siálico. SBA, una lectina que tiene afinidad para GalNAc no inhibió ni la unión de la proteína Cry1Ab ni de la Cry1F a las BBMV de *O. nubilalis*. WGA, otro tipo de lectina con afinidad para GlcNAc, tampoco afectó a la unión de ambas toxinas y, de la misma forma, la preincubación de las BBMV con la concanavalina A (que tiene afinidad por la manosa y los residuos de glucosa) no tuvo ningún efecto sobre la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F. En conclusión, nuestros resultados indican que el ácido siálico (pero no GalNAc) podría

desempeñar un papel en la unión de la proteína Cry1F a las BBMV de *O. nubilalis* o bien que la zona de unión del ácido siálico a la proteína Cry1F podría estar cercana a los epítomos con los cuales esta toxina une a los receptores de membrana en *O. nubilalis*. Esta diferencia entre las proteínas Cry1Ab y Cry1F apoya a la hipótesis de la existencia de distintos receptores específicos para cada toxina.

La caderina ha sido identificada como un receptor de las proteínas Cry1A situado en el epitelio intestinal de muchas especies de lepidópteros, como por ejemplo *M. sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1993; 1995), *H. virescens* (Jurat-Fuentes y Adang, 2006b), *B. mori* (Nagamatsu *et al.*, 1998a; 1998b), *H. armigera* (Wang *et al.*, 2005a), *P. gossypiella* (Fabrick y Tabashnik, 2007) y *O. nubilalis* (Flannagan *et al.*, 2005). En nuestros ensayos de inmunodetección de la unión de la toxina Cry1Ab (pero no de la Cry1F) a proteínas de las BBMV de *O. nubilalis* detectamos una banda de alrededor de 250 kDa que parece corresponder a un doblete de 250 kDa reconocido por el anticuerpo anti-caderina. Previamente, estudios realizados con BBMV de diferentes colonias de *O. nubilalis* correlacionaron bandas de 220 – 250 kDa inmunodetectadas en la unión de la proteína Cry1Ab con bandas reconocidas por anticuerpos anti-caderina (Hua *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004a; Flannagan *et al.*, 2005; Siqueira *et al.*, 2006). En contraste con nuestros resultados, en otros estudios también la unión de la proteína Cry1F se inmunodetectó en bandas de alto tamaño molecular (200 - 220 kDa) que parecían corresponder a las bandas producidas por la unión de anticuerpos anti-caderina (Hua *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2010). Considerando que en nuestros ensayos la detección de la banda de 250 kDa observada en la unión de la proteína Cry1Ab fue siempre muy débil, podemos apuntar que la proteína Cry1F tuviera una menor afinidad por las proteínas que componen dicha banda y que por esa razón no logramos detectar claramente la unión. De todas formas, la aparición de la banda de 250 kDa, tanto en la inmunodetección de la caderina como en la inmunodetección de la unión de la proteína Cry1Ab dependía fuertemente del estado de conservación de las BBMV, ya que periodos de conservación prolongados provocaban la ausencia de detección de tal banda. No obstante, cabe destacar que aunque el anticuerpo anti-caderina reconoce una banda de 250 kDa, en la identificación de los péptidos pertenecientes a la banda de 250 kDa de las BBMV de *O. nubilalis* por LC/MS-MS no encontramos homología con ninguna proteína descrita en las bases de datos y no pudimos confirmar su naturaleza. Para comprobar el papel de la caderina en la unión de las proteínas Cry utilizamos un anticuerpo específico contra ella para interferir la unión en solución de las proteínas Cry a las BBMV. Otros estudios han descrito una reducción en la toxicidad de las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac frente a

larvas de *B. mori* y de *H. armigera*, respectivamente, que habían sido previamente alimentadas con un anticuerpo específico anti-caderina (Nagamatsu *et al.*, 1998b; Xie *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010a). Adicionalmente, en *B. mori* se inhibió la unión de la proteína Cry1Ab a las BBMV de una cepa susceptible mediante la preincubación con un anticuerpo anti-caderina, y el mismo anticuerpo protegió las células disgregadas del epitelio intestinal de la acción citotóxica de la proteína Cry1Ab (Ibiza-Palacios *et al.*, 2008). Similarmente, en *H. armigera* la preincubación de las BBMV con un anticuerpo anti-caderina afectó a la unión de la proteína Cry1Ac (Liu *et al.*, 2010a). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F biotiniladas a las BBMV frescas de *O. nubilalis* no disminuía después de las preincubaciones con el anticuerpo anti-caderina, sugiriendo que la caderina no era una molécula importante en la unión de ninguna de las dos toxinas, al menos, bajo nuestras condiciones de ensayo de unión en solución. La caderina de *O. nubilalis* OnBt-R₁ ha sido descrita como receptor de la proteína Cry1Ab después de ser expresada en células Sf9 y provocar citotoxicidad en presencia de bajas concentraciones de la proteína Cry1Ab (Flanagan *et al.*, 2005). Sin embargo, su papel en la toxicidad *in vivo* no ha sido demostrado aún. Un extenso análisis del gen codificante para la caderina en una cepa de *O. nubilalis* resistente a Cry1Ab no encontró ninguna mutación que pudiera ser la causa de la resistencia y de la alteración de la unión de las proteínas Cry1A (Siqueira *et al.*, 2006; Bel *et al.*, 2009) y estudios de la segregación de la caderina en cepas resistentes a Cry1Ab y Cry1F tampoco pudieron demostrar ligamiento del gen con la resistencia (Coates *et al.*, 2008b; 2011). En conclusión, nuestros resultados sugieren que las proteínas Cry1Ab y Cry1F no se unen a la caderina en *O. nubilalis* y, por tanto, no apoyan a su posible rol en la toxicidad de esas proteínas Cry.

Los resultados de los ensayos de inmunodetección de las proteínas de las BBMV de *O. nubilalis* capaces de unir a las proteínas Cry1Ab y Cry1F mostraron otras dos bandas de alrededor de 75 y 150 kDa a las cuales se unieron ambas toxinas. La detección de bandas de alrededor de 150 kDa fue observada también en estudios previos, pero ésta es la primera vez que se describe la unión de unas proteínas Cry en *O. nubilalis* a una banda de 75 kDa (aunque mucho más débil respecto a la señal de la banda de 150 kDa). Hua y colaboradores (2001) fueron los primeros en inmunodetectar la unión de la proteína Cry1Ab a tres bandas de 145, 154 y 167 kDa que correspondieron al tamaño de las bandas reconocidas por un anticuerpo anti-APN. En el mismo estudio, describieron la unión de la proteína Cry1F a las bandas de 154 y 167 kDa. Otro autores observaron la unión de las

proteínas Cry1Ab y Cry1F a bandas de 130 - 150 kDa de las BBMV de *O. nubilalis* y que en unos casos correspondieron al mismo tamaño de las bandas detectadas por un anticuerpo anti-APN4 de *O. nubilalis* (Li *et al.*, 2004a; Pereira *et al.*, 2010; Crespo *et al.*, 2011). En nuestros ensayos, en la banda de 130-150 kDa en que se inmunodetectó la unión de las proteínas Cry1Ab y Cry1F identificamos la presencia abundante de péptidos pertenecientes a las enzimas *OnAPN1*, *OnAPN3a*, *OnAPN3b*, seguidos por *OnAPN3c*, *OnAPN2* y *OnAPN8* y pudimos así confirmar las suposiciones sobre la naturaleza de tal banda. Las APN han sido ampliamente descritas por su capacidad de unir a las proteínas Cry en diferentes especies de lepidópteros y de dípteros (Pigott y Ellar, 2007; Bravo *et al.*, 2011), pero esta sería la primera vez en la que se describe la interacción de las toxinas Cry con las APN del epitelio intestinal de *O. nubilalis*. Se encontró homología con *OnAPN* también en la banda de 75 kDa, en la cual se identificaron muchos péptidos pertenecientes a *OnAPN4* y *OnAPN1*. En este caso, podría tratarse de productos de degradación de las APN ya que normalmente estas enzimas tienen un tamaño de alrededor de 100 kDa (Pigott y Ellar, 2007). Tanto en la banda de 150 kDa como en la banda de 75 kDa, identificamos también péptidos con homología a las v-ATPasas de *M. sexta*, *T. castaneum* y *D. plexippus*, a pesar de que el tamaño predicho de todas estas proteínas es de 93-95 kDa. Se ha descrito que la toxina Cry1Ac une a la subunidad A de la v-ATPasa presente en las BBMV de *H. virescens* (Krishnamoorthy *et al.*, 2007) y a la subunidad B de la v-ATPasa del epitelio intestinal de *H. armigera* (Chen *et al.*, 2010b) y por lo tanto, también podrían ser receptores de las proteínas Cry1Ab y Cry1F en *O. nubilalis*. Otras proteínas con las que encontramos homología con la banda de 75 kDa fueron la fosfatasa alcalina de *M. configurata* y las HSC70 de *P. interpunctella*, *S. frugiperda* y *L. sticticalis*. Ambas proteínas han sido descritas como receptores de las proteínas Cry en lepidópteros. Mientras que la capacidad de unión de la fosfatasa alcalina a las BBMV de *H. virescens* y de *M. sexta* ha sido bien estudiada (Pigott y Ellar, 2007) la unión de la proteína Cry1Ac a una HSC del epitelio intestinal de *H. armigera* ha sido descrita en un solo estudio (Chen *et al.*, 2010b).

5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS APN DE *O. nubilalis* E INTERACCIÓN CON LAS PROTEÍNAS Cry

Las APN intestinales han sido intensamente estudiadas en los lepidópteros debido a su posible rol como receptores de las proteínas Cry (Pigott y Ellar, 2007; Bravo *et al.*, 2011). Estos trabajos de investigación han dado como fruto una cantidad considerable de información sobre la filogenia de esta gran familia

proteica y sobre las interacciones de sus miembros con las proteínas Cry. Diferentes APN han sido expresadas con éxito en sistemas heterólogos para estudios de unión con las proteínas Cry. De la misma manera, muchas isoformas han sido purificadas por cromatografía de afinidad. En cepas de diferentes especies de lepidópteros se ha correlacionado la resistencia con mutaciones dentro de la secuencia codificante de alguna APN o con una disminución de la expresión de alguna isoforma (Herrero *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Tiewsi y Wang, 2011). En *O.nubilalis*, mutaciones dentro de una aminopeptidasa P (APP), otro tipo de aminopeptidasa catalíticamente diferente de las APN, han sido encontradas en dos colonias resistentes comparadas con colonias susceptibles (aunque no se confirmó su ligamiento genético) (Khajuria *et al.*, 2011). A pesar de la cantidad de trabajo realizado, aún no se conoce con certidumbre la función de estas enzimas en la citotoxicidad de las proteínas Cry. En particular, falta por aclarar si todas las isoformas o solo algunas de ellas son capaces de interactuar con las proteínas Cry y por tanto cubrir el papel de receptores. En nuestro estudio, hemos secuenciado por primera vez cinco aminopeptidasas intestinales (*OnAPN1*, *OnAPN2*, *OnAPN3b*, *OnAPN8* y *OnPSA*) y completado la secuenciación de otras dos parcialmente descritas (*OnAPN3a* y *OnAPN4*). Estas siete enzimas han sido caracterizadas y se ha demostrado su expresión en el intestino de *O. nubilalis*. De ellas, seis pertenecen a la familia de las APN relacionadas con Bt en lepidópteros. Estas isoformas fueron expresadas en células Sf21 y se estudió tanto su actividad enzimática (para determinar si se trataba de isoformas funcionalmente diferentes) como su capacidad de unión a las proteínas Cry1Ab y Cry1F.

Los resultados de la caracterización de las secuencias codificantes revelaron que las características típicas de las aminopeptidasas de lepidópteros, como el motivo de unión al zinc HEXXH (X)₁₈E y la secuencia GAMEN, estaban presentes en todos los transcritos estudiados. Seis secuencias se pudieron clasificar como *OnAPN* porque tenían tamaño parecido a las APN de otros lepidópteros e incluían secuencias señales para modificaciones posttraduccionales como el péptido señal en el extremo N-terminal para la exportación de la molécula fuera del citoplasma o la señal de anclaje al GPI en el extremo C-terminal, además de diferentes sitios posibles de glicosilación. Un rasgo característico de las APN de lepidópteros pertenecientes a las clase 1 y 3 es un motivo rico en treoninas, cercano al anclaje GPI que ha sido identificado también en la APN5 de *H. armigera* (Pigott y Ellar, 2007). En las *OnAPN* tal característica está presente en las secuencias de las isoformas pertenecientes a las clases 1 y 3. Es interesante notar que, según nuestras predicciones, todos los posibles sitios de O-glicosilación se encontraron en

la región rica en treoninas. La O-glicosilación de esta región ha sido anteriormente descrita y se piensa que sirve para formar una estructura rígida que eleva el sitio activo del enzima, separándolo de la superficie de la membrana (Pigott y Ellar, 2007). En particular, se ha detectado un mayor número de posibles sitios de O-glicosilación en las *OnAPN3* (3 en la *OnAPN3a* y 5 en la *OnAPN3b*) respecto a la *OnAPN1* (1 solo sitio). Por el contrario, en otras especies de lepidópteros las proteínas con más sitios posibles de O-glicosilación pertenecen a la clase 1 (Pigott y Ellar, 2007).

El motivo del péptido señal y, consecuentemente, la señal para el anclaje GPI no se encontraron en la secuencia de la proteína denominada *OnPSA*, sugiriendo que esta proteína no se exporta fuera del citoplasma. La secuencia traducida *in vitro* constó de 555 aminoácidos que componían una proteína truncada debido a un codón de parada prematuro presente en el transcrito. Un gen ortólogo fue localizado en el cromosoma 11 de *B. mori* y en este caso, codifica para una proteína de 865 aminoácidos. Según el análisis de homología tBLASTx, la proteína *OnPSA* muestra una similitud alta con la familia de las aminopeptidasas sensibles a puromicina (PSA). Las PSA han sido descritas como un grupo de aminopeptidasas principalmente citoplasmáticas que desempeñan su función en diferentes procesos celulares, en particular en la regulación del ciclo celular (Tobler *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1999). Estudios de identidad confirmaron que esta secuencia era más cercana a las PSA de *D. melanogaster* y de humano (alrededor del 40% de identidad) que a las APN de lepidópteros (alrededor del 15 % de identidad). Las proteínas PSA de *D. melanogaster* y humano, ortólogas a *OnPSA*, tenían un tamaño de alrededor de 900 aminoácidos, añadiendo más valor a la hipótesis de que esta última fuera una forma truncada. Esta proteína truncada podría ser o no funcional ya que en *D. melanogaster* la falta de PSA debida a deleciones en el gen que la codifica no resulta en ningún fenotipo anormal, siendo los individuos mutantes viables, de fenotipo corporal normal y capaces de producir una progenie fértil (Schulz *et al.*, 2001).

El análisis filogenético de las aminopeptidasas de *O. nubilalis* y de *B. mori*, junto con todas las secuencias completas correspondientes a las aminopeptidasas de lepidópteros depositadas en la base de datos GenBank, resultó en la agrupación de las aminopeptidasas en nueve clases, dos más de las descritas por Angelucci *et al.* en el 2008. Los dos nuevos grupos están formados: uno por las proteínas *OnAPN8* y *BmAPN8* junto a una APN de *S. litura*, y el otro por *OnPSA* y *BmPSA*. Adicionalmente, dos secuencias parciales descritas en *P. xylostella*, P_xAPN-G

(GenBank EF579957) y PxAPN-E (Genbank EF579959), apoyan la existencia de estas dos nuevas clases. Recientemente, un estudio sobre las aminopeptidasas de *O. nubilalis* ha descrito hasta 10 transcritos diferentes (Khajuria *et al.*, 2011), confirmando el gran número de genes que forman esta familia proteica en los Lepidóptera.

Las *OnAPN* muestran un porcentaje de identidad entre ellas que varía del 25 hasta el 39% mientras que en *B. mori* la identidad entre isoformas va del 24 hasta el 40%, con la excepción de *BmAPN7* la cual no comparte más que el 15% de identidad con las otras *BmAPN*. Comparando las *OnAPN* con las secuencias ortólogas de otras especies de lepidópteros, vimos que los valores de identidad son mucho más altos dentro de cada una de las clases de APN que entre las isoformas de diferentes clases pertenecientes a la misma especie, yendo (dentro de cada clase) del 50% de identidad cuando se confrontan APN de especies filogenéticamente distantes hasta un 95% cuando se comparan APN de otras especies del mismo género como *O. furnacalis*. A diferencia de lo descrito en otros lepidópteros, en *O. nubilalis* encontramos dos isoformas que pertenecen a la clase 3 y que nombramos *OnAPN3a* y *OnAPN3b*. La identidad aminoacídica entre ellas es muy alta (74%), pero al compararlas con la APN3 de *O. furnacalis*, los porcentajes de identidad son muy diferentes, siendo *OnAPN3a* mucho más parecida (96%) que *OnAPN3b* (74%). Estos hechos nos sugirieron que las dos secuencias identificadas en *O. nubilalis* no eran alelos del mismo *locus*, si no transcritos de genes diferentes. Recientemente, en la base de datos Genbank se ha descrito una tercera isoforma (*OnAPN3c*) perteneciente a la clase 3 de las APN de *O. nubilalis* (GenBank JF339040). Una búsqueda de homología con la herramienta Blast en el genoma anotado de *B. mori*, utilizando tanto *OnAPN3a* como *OnAPN3b*, ha resultado en la obtención de una sola secuencia perteneciente a la clase 3. Parece que la existencia de múltiples isoformas de APN3 en *O. nubilalis* podría deberse a eventos de duplicación génica concretamente ocurridos en esta especie. Una posible duplicación génica de los genes codificantes las aminopeptidasas había sido sugerida también para *P. xylostella* (Baxter *et al.*, 2008), después de encontrar dos secuencias parciales con homología a la clase 4 pero diferentes entre ellas y una EST con homología a la clase 3 pero sustancialmente diferente de la APN3 de *P. xylostella* descrita anteriormente (Nakanishi *et al.*, 2002). El hecho de que las APN de lepidópteros sean mucho más parecidas entre la misma clase que dentro la misma especie parece indicar que todos los componentes de esta familia proteica derivan de múltiples eventos de duplicación génica ocurridos en un lepidóptero ancestral (Chang *et al.*, 1999; Angelucci *et al.*, 2008). La hipótesis de que posibles

eventos de duplicación hayan originado las diferentes isoformas de APN está apoyado por la estructura genómica de estos genes en los lepidópteros: todos los genes codificantes para las APN en *B. mori*, *H. armigera* y *S. frugiperda* se encuentran en una región de alrededor de 150 kB situada en mismo grupo de ligamiento, el cromosoma 9 (d'Alençon *et al.*, 2010). El cartografiado de las *OnAPN* muestra sintonía con la organización génica de *B. mori*, ya que todas las *OnAPN* se agrupan en el mismo grupo de ligamiento indicando proximidad física de los genes (Crava *et al.*, 2010). De la misma forma, las APN de *P. xylostella* se localizan en un único grupo de ligamiento (Baxter *et al.*, 2008). La única aminopeptidasa que no localiza en la misma región es la PSA que, según el análisis filogenético, no pertenece a la familia proteica de las APN. Su presencia en el cromosoma 11 de *B. mori* y en otro grupo de ligamiento diferente respecto a las APN de *P. xylostella* no parece proceder de duplicación génica, si no que habría podido generarse por una translocación cromosómica ocurrida durante el proceso evolutivo.

La expresión de las aminopeptidasas de lepidópteros ha sido tradicionalmente asociada al intestino medio de las larvas (Pigott y Ellar, 2007) y las *OnAPNs* fueron clonadas a partir de ADNc de intestino. Sin embargo, el intestino no es el único tejido donde se expresan las aminopeptidasas de lepidópteros. En nuestro estudio observamos la presencia de transcritos codificantes para la isoforma *OnAPN8* en los túbulos de Malpighio al mismo nivel que en el intestino, así como una expresión mínima de los genes *onapn3a* y *onapn4*. Se observó una expresión residual del gen *onapn3a* también en el cuerpo graso, mientras que no se encontró ningún transcrito de ninguna APN en la carcasa. El patrón de expresión de la proteína *OnPSA* fue el más diferente, ya que sus transcritos fueron encontrados en todos los tejidos analizados. Los perfiles de expresión de los genes codificantes para las aminopeptidasas de *B. mori*, extrapolados de los resultados de un estudio con micromatrices (Xia *et al.*, 2007), concuerdan con el patrón de expresión evidenciado en *O. nubilalis*. Todos los genes ortólogos a las *OnAPN* están fuertemente expresados en el intestino medio y *bmapn8* está expresado también en los túbulos de Malpighio. La expresión de *bmapn2*, *bmapn3* y *bmapn4* parece ser específica del intestino mientras que, a diferencia de *O. nubilalis*, los transcritos de *bmapn1* también se encuentran en niveles consistentes en los túbulos de Malpighio. Finalmente, la expresión del gen *bmps* es ubicua, como ocurre con su ortólogo *onpsa*. Estos resultados son parcialmente consistentes con estudios previos realizados con diferentes especies de lepidópteros. En *T. ni*, la expresión de *apn1* y *apn4* fue claramente observada en los

túbulos de Malpighio (aunque a niveles menores que en el intestino) y ninguna actividad aminopeptidásica se encontró en el cuerpo graso, en la carcasa y en las glándulas salivares (Wang *et al.*, 2005b). En *E. postvittana*, la expresión de todas las APNs fue detectada en cada uno de los tejidos examinados (intestino medio, intestino posterior, cuerpo graso, túbulos de Malpighio y carcasa), aunque la expresión más fuerte fue siempre descrita en el intestino medio mientras que en los otros tejidos los niveles de expresión encontrados fueron casi siempre residuales (Simpson *et al.*, 2008). Posteriormente a nuestro estudio, Khajuria y colaboradores (2011) publicaron el análisis de la expresión de diez genes parecidos a APN en *O. nubilalis*. En casi todos los casos, los transcritos fueron encontrados casi exclusivamente en el intestino medio, aunque un gen mostró una expresión específica en los túbulos de Malpighio y los transcritos de otro se detectaron tanto en el intestino medio como en el posterior. En los lepidópteros, han sido descritas hasta ahora solo dos isoformas expresadas en el cuerpo graso (pertenecientes a las especies *S. litura* y *A. janata*) y en *S. litura* la expresión de la APN8 pareció ser específica para este tejido (Budatha *et al.*, 2007a; 2007b). Excepto para la expresión de las APN en el intestino, donde estas enzimas son fundamentales en la digestión de los péptidos, los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que la expresión específica de algunas isoformas en otros tejidos varía según la especie. Podemos especular que esta expresión diferencial ocurre en función de las diferentes dietas de las cuales se alimentan las diferentes especies, en particular para las isoformas expresadas en los túbulos de Malpighio, ya que estos últimos colaboran con el intestino de las larvas en la absorción de las sustancias nutrientes (Ogutcu *et al.*, 2005). En *H. armigera* se ha demostrado por RT-PCR semi-cuantitativa la expresión diferencial de las aminopeptidasas dependiendo de la dieta empleada en la cría de las larvas (Chougule *et al.*, 2005). Se podría también especular que la expresión de las APN en el intestino y en los túbulos de Malpighio de los lepidópteros podría tener una correspondencia con la expresión de las APN en los mamíferos, en los cuales estas enzimas están preferentemente expresadas en el intestino, donde actúan como enzimas digestivas, y en el hígado, donde actúan activando o inactivando hormonas (Vlahovic y Stefanovic, 1998). La expresión de *psa* en todos los tejidos analizados, tanto en *O. nubilalis* como en *B. mori*, concuerda con el resultado del análisis filogenético ya que el gen ortólogo mejor caracterizado es el de humano y también tiene una expresión ubicua como ocurre en los lepidópteros (Tobler *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1999). Por cuanto concierne el patrón de expresión temporal, hemos confirmado la presencia constante de los transcritos de todas las *OnAPN* y de *OnPSA* en el intestino medio de *O. nubilalis* durante todo el ciclo larval. En *E. postvittana* la expresión de las APN de las clases 1- 5 se encontró en

todos los estadios larvarios y, en menor proporción, en los huevos, las pupas y los adultos (Simpson *et al.*, 2008). De manera parecida los transcritos de las APN 1-4 de *H. armigera* (Angelucci *et al.*, 2008) y de las APN 1-3 de *H. punctigera* (Emmerling *et al.*, 2001) se encontraron expresados durante todo el desarrollo larvario, aunque en el último caso los análisis de northern blot revelaron una regulación dependiente del desarrollo, sobre todo por la APN1. La expresión de las APN durante el ciclo larvario probablemente está relacionada con la necesidad constante de las larvas de comer, para almacenar energía y metabolitos necesarios para el crecimiento y la metamorfosis.

Las seis *OnAPN* caracterizadas en este trabajo se intentaron expresar en células Sf21 utilizando un sistema basado en baculovirus. La expresión de cinco isoformas (*OnAPN1*, *OnAPN2*, *OnAPN3a*, *OnAPN3b* y *OnAPN8*) se pudo observar por SDS-PAGE, inmunodetección de la cola de histidina y actividad aminopeptidásica (en este último caso con la excepción de la isoforma *OnAPN3b*), confirmando que cuatro de las cinco proteínas expresadas eran biológicamente activas bajo nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, no logramos obtener una expresión detectable de la isoforma *OnAPN4*. Las cinco isoformas correctamente expresadas tenían tamaños aparentes en SDS-PAGE comprendidos entre 100 y 150kDa y estos tamaños se correlacionaban con las masas calculadas por el análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica deducida. El anticuerpo específico utilizado para la inmunodetección de la cola de histidina, presente en el extremo C-terminal de las proteínas recombinantes, reconoció dos bandas de tamaño parecido por cada proteína expresada: una de mayor intensidad y otra mucho más débil. El procesamiento de las proteínas con una señal de anclaje al GPI ocurre en el retículo endoplasmático de las células, donde una primera proteólisis elimina el péptido señal del extremo N-terminal liberando las pro-proteínas (que aún contienen la señal de anclaje al GPI en el extremo C-terminal). Seguidamente, una reacción catalizada por un complejo de transamidasa GPI elimina esta señal y combina el extremo C-terminal de las proteínas con un precursor del GPI (Ikezawa, 2002). Las dos bandas reconocidas por el anticuerpo anti histidina podrían corresponder a diferentes intermediarios del proceso de maduración ya que, en realidad, las *OnAPN* maduras tendrían que haber perdido la cola de histidina presente en el extremo C-terminal, por lo que se harían indetectables por este sistema. De hecho, ya se publicó en 2002 (Agrawal *et al.*) la detección de la cola de histidina (situada en el extremo C-terminal) de una APN recombinante de *S. litura* expresada en células Sf21. En este caso la inmunodetección de la cola de histidina resultó en una única banda mientras que la inmunodetección de la APN con un

anticuerpo específico evidenció la presencia de dos bandas que los autores especularon correspondieran a la forma madura de la APN y a la pro-proteína con el extremo C-terminal intacto.

Como característica general, las APN cortan los aminoácidos neutros de la extremidad N-terminal de los péptidos. Sin embargo, la especificidad de sustrato de las APN de los lepidópteros parece ser relativamente amplia, ya que se ha descrito que ciertas isoformas pueden hidrolizar diferentes aminoacil- β -naftilamidas, excepto las formas ácidas (Terra y Ferreira, 2012). Terra y Ferreira (2012) han propuesto que la presencia de múltiples APN en el intestino de los dípteros y de los lepidópteros está relacionada con la necesidad de poder disponer de diferentes especificidades de sustrato. Otros autores han sugerido que las diferentes isoformas de estas enzimas podrían ser importantes en la adaptación de los lepidópteros a los inhibidores de proteasas presentes en las diferentes plantas de que se alimentan las larvas (Lomate y Hivrale, 2011). En particular, la regulación de las APN podría ayudar a superar los efectos causados por la inhibición de otras proteasas intestinales (Lara *et al.*, 2000; Vila *et al.*, 2005). Los resultados de esta tesis indican que las isoformas de *OnAPN* expresadas en el intestino de *O. nubilalis* tienen diferentes especificidades de sustrato. Tres de las cinco *OnAPN* (2, 3a y 8) fueron capaces de hidrolizar ambos sustratos neutros ensayados (Leu-*pNA* y Ala-*pNA*), pero solo *OnAPN8* mostró una preferencia significativa para uno de los dos (Ala-*pNA*). La isoforma *OnAPN1* hidrolizó únicamente la Leu-*pNA* mientras que la isoforma *OnAPN3b* no mostró actividad con ninguno de los sustratos empleados. La utilización de un tercer sustrato (Lys-*pNA*), en este caso básico, reveló la actividad enzimática de las isoformas *OnAPN3a* y *OnAPN8* mientras que las otras dos isoformas capaces de hidrolizar los sustratos neutros mostraron solamente una actividad aminopeptidásica residual. En *H. armigera*, la actividad aminopeptidásica medida en larvas alimentadas con plantas habitualmente presentes en la dieta del insecto mostró una preferencia para el sustrato Leu-*pNA* mientras que cuando se cambió la dieta, introduciendo plantas que no eran normalmente huéspedes de las larvas, el sustrato hidrolizado con mayor eficacia fue la Ala-*pNA*, sugiriendo que la expresión de una u otra isoforma de APN dependía del sustrato sobre el cual se alimentaban las larvas (Lomate y Hivrale, 2011). Cabe notar que la presencia de múltiples APN pertenecientes a la clase 3 es una característica peculiar de *O. nubilalis*. La isoforma más parecida a las APN3 descritas en las otras especies de lepidópteros, *OnAPN3a*, fue capaz de hidrolizar todos los sustratos ensayados, a diferencia de *OnAPN3b* que no tuvo actividad en ningún caso, a pesar de tener una expresión detectable y ninguna mutación en los motivos funcionales. Sería

interesante realizar más ensayos para profundizar si se trata de una isoforma no funcional o de un enzima activo bajo condiciones de pH o de sustrato muy diferentes de las otras *OnAPN*. Los niveles de actividad aminopeptidásica observados para las isoformas *OnAPN1*, *OnAPN2*, *OnAPN3a* y *OnAPN8* fueron comparables con los resultados de estudios previos en los cuales se expresaron APN de diferentes especies de lepidópteros en células de insecto (Agrawal *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2003), con la excepción de la isoforma *OnAPN8* que mostró una actividad de 6 a 10 veces superior a la de las otras *OnAPN*. Solo en un estudio de expresión de una aminopeptidasa perteneciente a la clase 3 de *E. postvittana* en células sf9 se obtuvieron niveles de expresión similares a los obtenidos con la *OnAPN8* (Simpson y Newcomb, 2000). Las razones de esta alta actividad podrían depender de factores relacionados con la expresión de la proteína en un sistema heterólogo y ulteriores estudios serían necesarios para purificar el enzima y caracterizar su cinética real de proteólisis.

Otro paso en la caracterización de la actividad aminopeptidásica consistió en valorar la sensibilidad de cada *OnAPN* a diferentes inhibidores. La inhibición por EDTA fue parecida en todas las isoformas y confirmó que estas enzimas eran metalloproteasas. La concentración de EDTA de 10 mM provocó una reducción de la actividad aminopeptidásica entre el 13 y el 49% y la concentración de 100 mM una reducción entre el 70 - 95%. No se observó ningún efecto significativo de los inhibidores actinonina y bestatina sobre la actividad catalítica de *OnAPN1*, mientras que las isoformas *OnAPN2*, *OnAPN3a* y *OnAPN8* se mostraron sensibles en diferentes medidas a cada uno de los inhibidores. Las enzimas *OnAPN2* y *OnAPN8* se observaron más sensibles a la bestatina con respecto a la actinonina, mientras que la actividad de *OnAPN3a* se redujo un 20% en presencia de ambos inhibidores. La isoforma *OnAPN8*, que mostró una actividad mucho mayor respecto a las otras *OnAPN*, también fue más sensible a todos los inhibidores ensayados, en particular a la bestatina. Los niveles de inhibición encontrados en nuestro estudio (excepto en el caso de la *OnAPN1*, que resultó insensible tanto a bestatina como a actinonina) concuerdan con los porcentajes de inhibición de la actividad catalítica encontrados en estudios parecidos (Denolf *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1999; Agrawal *et al.*, 2002). Tanto las diferencias en la especificidad de sustrato como la sensibilidad a los inhibidores indican que las *OnAPN* expresadas en las células Sf21 son enzimas catalíticamente distintas, cada cual con características bioquímicas propias. Como consecuencia, podemos especular que estas diferentes isoformas expresadas en el intestino de *O. nubilalis* podrían tener funciones diferentes o estar reguladas de distinta forma, según la exigencias del insecto.

Como se ha resaltado anteriormente, las APN de lepidópteros han sido extensivamente estudiadas por su implicación como receptores candidatos de las toxinas Cry. Con el fin de demostrar tal interacción de forma clara, a lo largo de estos últimos diez años, varias isoformas han sido purificadas de la membrana epitelial de las larvas o expresadas en sistemas heterólogos como *E. coli* o células de insecto para probar su capacidad de unión a las toxinas Cry (Pigott y Ellar, 2007). Con este mismo objetivo, en nuestro estudio realizamos ensayos de inmunotinción de la unión de las toxinas Cry a las *OnAPN* expresadas en las células Sf21. Los resultados mostraron que las diferentes isoformas de *OnAPN* expresadas en las células Sf21 eran capaces de unir de forma diferencial a las proteínas Cry1Ab y Cry1F, confirmando en parte los resultados obtenidos en la identificación de las proteínas de las BBMV de *O. nubilalis* que componían las bandas inmunodetectadas tras la unión de las toxinas Cry. Estudios anteriores al nuestro habían expresado APN de lepidópteros en células de insecto y habían observado, mediante la misma técnica que utilizamos en esta tesis, la capacidad de unión de las células enteras mediada por las APN (Agrawal *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2003). Por el contrario, otros autores emplearon una aproximación diferente como el ensayo de unión en solución (utilizando fracciones de membrana celular) y en este caso no consiguieron demostrar unión específica entre las APN expresadas en células Sf9 y las proteínas Cry (Denolf *et al.*, 1997; Simpson y Newcomb, 2000). Una tercera técnica utilizada, la inmunodetección de la unión de las proteínas Cry a APN expresadas en sistemas heterólogos, desnaturalizadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas, dio resultados contradictorios, bien mostrando en unos casos la unión a las APN expresadas o bien no detectando ninguna interacción con las proteínas Cry (Denolf *et al.*, 1997; Garner *et al.*, 1999; Simpson y Newcomb, 2000; Chen *et al.*, 2009). La comparación de todos estos experimentos resulta muy difícil, ya que en cada caso se trata de una isoforma diferente de APN perteneciente a una especie diferente y expresada en diferentes tipos celulares (células Sf21, Sf9 o S2). El estudio realizado a lo largo de esta tesis, es el primero en el cual se expresan con el mismo sistema cinco APN procedentes del mismo insecto y se compara la capacidad de unión de cada isoforma (sin desnaturalizar las proteínas como ocurre en los ensayos de inmunodetección) frente a dos proteínas Cry, pertenecientes a clases diferentes y altamente tóxicas para a *O. nubilalis*. Anteriormente, Rajagopal y colaboradores (2003) habían sido los únicos en demostrar, mediante inmunodetección de la unión de las proteínas Cry, que las APN 1 y 3 de una misma especie (*H. armigera*) expresadas en células Sf21 unen de forma diferencial a las toxinas de la clase Cry1A. En su revisión, Pigott y Ellar (2007) resumieron todos los experimentos realizados con APN y toxinas Cry, intentando reunir, para cada

clase de APN, las evidencias que se habían generado para probar su unión con las proteínas Cry. Al día de hoy, las isoformas de la clase 1 y 3 han sido las más extensivamente estudiadas y se ha demostrado con diferentes metodologías que pueden unir a diferentes proteínas de la clase Cry1A (y también en ciertos casos a la proteína Cry1F) en diferentes especies de lepidópteros, tanto en la forma nativa de las proteínas así como en su forma desnaturalizada. Las isoformas pertenecientes a la clase 2 han sido mucho menos estudiadas y la unión a las proteínas Cry no se ha clarificado, ya que los resultados obtenidos son discordantes. Por un lado, la expresión de la APN2 de *P. xylostella* en células Sf9 no resultó en ningún tipo de interacción con las proteínas Cry, tanto en ensayos de unión en solución como mediante inmunodetección de la unión de Cry1Ab (Denolf *et al.*, 1997). Por el otro, la supuesta región de unión a las proteínas Cry de esta misma APN, expresada en *E. coli*, sí que mostró interacción tanto con la proteína Cry1Aa como con la Cry1Ab (Nakanishi *et al.*, 2002). Otros estudios han mostrado que las isoformas pertenecientes a la clase 4 de *H. virescens* y *S. litura*, expresadas en células de insecto, son capaces de unir bien a las proteínas Cry1Ac y Cry1F o bien a la proteína Cry1C (Banks *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 2002). Finalmente, la clase 5 ha sido la menos estudiada, tanto en el número de miembros identificados, como en la caracterización de la interacción con las toxinas Cry. Un solo estudio ha demostrado la unión de una región de la APN5 de *P. xylostella* expresada en *E. coli* a las proteínas Cry1Aa y Cry1Ab (Nakanishi *et al.*, 2002) y más evidencias se necesitarían para confirmar tal interacción. Nuestros resultados, los primeros generados en *O. nubilalis*, concuerdan con este cuadro general. Ambas isoformas OnAPN1 y OnAPN3a (la más parecida a las APN3 de otros lepidópteros) unieron a la proteína Cry1F, y la OnAPN1 unió también a la proteína Cry1Ab. Por el contrario, las isoformas OnAPN2 y OnAPN3b no interaccionaron con ninguna de las toxinas ensayadas. Adicionalmente, por primera vez hemos estudiado la unión de una APN perteneciente a la clase 8 a las proteínas Cry, detectando unión solamente con la toxina Cry1F. Un estudio anterior había observado la unión de la proteína Cry1C a una isoforma de la misma clase, pero en este caso se trataba de una proteína expresada específicamente en el cuerpo graso de *S. litura* y no en el intestino (Budatha *et al.*, 2007b). La unión de ambas proteínas Cry1Ab y Cry1F a la OnAPN1 y la unión exclusiva de la proteína Cry1F a las isoformas OnAPN3a y OnAPN8 se podrían relacionar con el modelo de receptores sugerido por Hua y colaboradores (2001) para *O. nubilalis*. Según este modelo, en la membrana epitelial de *O. nubilalis* existiría un sitio de unión de alta afinidad para la proteína Cry1Ab compartido con la proteína Cry1F, la cual se uniría con baja afinidad, y que podría ser OnAPN1 y un segundo sitio de unión de alta afinidad exclusivo para la

proteína Cry1F (que podrían ser *OnAPN3a* y/o *OnAPN8*). Es interesante notar que los resultados obtenidos por inmunohistoquímica se correlacionan con los resultados observados en los ensayos de inmunodetección de la unión de las toxinas Cry a las BBMV de *O. nubilalis*. Las proteínas de las BBMV encontradas de forma más abundante en la banda de 150 kDa que unía a las proteínas Cry1Ab y Cry1F eran las *OnAPN* pertenecientes a las clase 1 y 3, mientras que en la banda de 75 kDa se encontraron muchos péptidos pertenecientes a las isoformas *OnAPN1* y *OnAPN4*.

En ciertos casos, se ha demostrado que la unión de las toxinas Cry a las células cultivadas de *S. frugiperda* (Sf21 o Sf9), mediada por la expresión de un receptor tal como las APN o la caderina, es suficiente para volver las células no susceptibles en susceptibles a las proteínas Cry (Nagamatsu *et al.*, 1999; Flannagan *et al.*, 2005; Sivakumar *et al.*, 2007; Deckhlar *et al.*, 2011). En los ensayos de mortalidad celular que realizamos exponiendo las células Sf21 que expresaban las *OnAPN* a las toxinas Cry, no se observó ninguna diferencia en citotoxicidad en comparación con las células control, indicando que la expresión de una *OnAPN* no es motivo suficiente para volver las células Sf21 susceptibles a las proteínas Cry1Ab o Cry1F. Diferentes autores han obtenido resultados parecidos a los nuestros (Garner *et al.*, 1999; Banks *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009), expresando APN de *L. dispar*, *H. virescens* y del díptero *Aedes aegypti*. Por otro lado, un solo estudio ha demostrado que la expresión de una APN podía mediar la citotoxicidad *ex vivo*: la expresión de la APN1 de *H. armigera* provocó la ruptura de alrededor del 30% de las células Sf21 incubadas con 25 µg/ml de Cry1Ac (Sivakumar *et al.*, 2007). Según el modelo del modo de acción de las proteínas Cry que indica la formación de un poro como causa de la muerte celular, la inserción de las toxinas en la membrana epitelial dependería de eventos de unión secuenciales con diferentes receptores entre los cuales se encuentran las proteínas con anclaje GPI (APN o ALP) y la caderina (Bravo *et al.*, 2011). El hecho de que la expresión de las *OnAPN* con evidencias de unión a las proteínas Cry1Ab y Cry1F en las células Sf21 no produjera susceptibilidad tras la exposición a las proteínas Cry podría depender de la falta de otras moléculas esenciales para completar el proceso tóxico. En conclusión, nuestros resultados demuestran que unas APN de *O. nubilalis* son capaces de unir a las proteínas Cry, de la misma forma que ocurre en otras especies de Lepidóptera, aunque ellas solas no son bastante para provocar susceptibilidad en células insensibles a Cry1Ab y Cry1F como las Sf21. Solamente la isoforma *OnAPN1* parece ser un candidato receptor para el modo de acción de la proteína

Cry1Ab, mientras que tanto *OnAPN1* como *OnAPN3a* y *OnAPN8* podrían formar parte del mecanismo de toxicidad *in vivo* de la proteína Cry1F.

El estudio de la función *in vivo* de las *OnAPN* en el mecanismo de acción de las proteínas Cry se abordó intentando silenciar la expresión de los genes que codifican para tales enzimas poniendo a punto un método de silenciamiento génico mediado por ARNi en *O. nubilalis*. Así, se suministró a las larvas ARNdc contra *OnAPN1* y *OnAPN2* (una isoforma capaz y otra incapaz de unir a ambas toxinas Cry1Ab y Cry1F bajo nuestras condiciones experimentales). En lepidópteros, se han ensayados diferentes métodos de suministro de ARNdc que se han demostrado eficaces para provocar silenciamiento tanto ambiental como sistémico de la expresión de los genes diana, como por ejemplo: inyección en las cavidades hemocelicas (Rajagopal *et al.*, 2002; Griebler *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010a; Hwang y Kim, 2011), en los embriones (Quan *et al.*, 2002; Fabrick *et al.*, 2004; Masumoto *et al.*, 2009), suministro por vía oral de ARNdc purificado (Turner *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2007; Griebler *et al.*, 2008; Cancino-Rodezno *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Khajuria *et al.*, 2010; 2011) o suministro de bacterias que expresan ARNdc (Tian *et al.*, 2009). También se han utilizado de forma exitosa los siRNA (Kumar *et al.*, 2009). Detrás de los éxitos en la técnica de ARNi descritos en literatura, en lepidópteros también se han obtenidos numerosos de fracasos que han sido recopilados y resumidos por Terenius y colaboradores en 2011. A pesar de haber probado varias técnicas de suministro y de producción de los ARNdc, en esta tesis no se logró ningún silenciamiento específico de los genes codificantes para las isoformas *OnAPN1* y *OnAPN2*. En nuestros experimentos, bien inyectamos ARNdc producido *in vitro* en larvas de quinto estadio o bien suministramos el ARNdc por vía oral. Este segundo método, además de no ser invasivo, nos permitió emplear larvas de menor tamaño, ya que el objetivo final era realizar bioensayos con las proteínas Cry frente a larvas con los genes *apn* silenciados, y la susceptibilidad de *O. nubilalis* a *B. thuringiensis* es dependiente del desarrollo larvario, siendo los últimos estadios mucho más resistentes a las proteínas Cry que las larvas neonatas (Huang *et al.*, 1999d). El empleo de grandes cantidades de ARNdc en el suministro por vía oral ha sido sugerido como el factor clave para la obtención de silenciamiento génico en los lepidópteros (Terenius *et al.*, 2011). La síntesis *in vitro* de ARNdc es un proceso relativamente costoso a nivel de tiempo y de material mientras que la utilización de la cepa de *E. coli* HT115 es una manera económica para producir grandes cantidades de ARNdc (Li *et al.*, 2011). El suministro de las bacterias *E. coli* que expresan ARNdc se optimizó para el silenciamiento mediado por ARNi en nematodos (Timmons *et al.*, 2001) y, en

insectos, se utilizó posteriormente para silenciar genes en *S. exigua* (Tian *et al.*, 2009) y en *Bactrocera dorsalis* (Li *et al.*, 2011). Nosotros pusimos a punto a punto una técnica de purificación del ARNdc producido por fermentación bacteriana que nos permitió obtener ARNdc altamente concentrado (6µg/µl), confirmando la utilidad de esta técnica para la producción en gran escala de ARNdc. El suministro de gotas de ARNdc bacteriano no produjo ningún efecto de silenciamiento específico de los genes codificantes las *OnAPN* 1 y 2. Para excluir la hipótesis de que estábamos utilizando una cantidad inadecuada de ARNdc alimentamos las larvas durante seis días directamente con bacterias que expresaban ARNdc, confirmando cada día la correcta expresión de los ARNdc. Tampoco con estas condiciones, los resultados de los análisis de expresión de las *apn* indicaron que no ocurría un silenciamiento específico de los genes diana. En la literatura existen dos ejemplos de silenciamiento de genes expresados en el intestino de *O. nubilalis* por suministro de ARNdc por vía oral y ambos están realizados por el mismo grupo. En el primer caso el gen diana fue una quitinasa y se observó una reducción en los transcritos del 64% (Khajuria *et al.*, 2010) mientras que en el segundo caso el gen silenciado codificaba para una APP relacionada con la resistencia a la proteína Cry1Ab, cuya la expresión se redujo hasta el 38% después del suministro de ARNdc (Khajuria *et al.*, 2011). En ambos trabajos, los autores mezclaron el ARNdc con la dieta de las larvas, empleando una cantidad total de ARNdc de 30 µg por cada larva, o sea 25 veces más de la cantidad máxima utilizada en nuestros experimentos. En otras especies de lepidópteros, se ha obtenido silenciamiento efectivo suministrando por vía oral cantidades más pequeñas de ARNdc, entre 250 ng y 3 µg por larva (Huvenne y Smagghe, 2010). En un experimento de silenciamiento génico mediado por suministro de ARNdc por vía oral con el lepidóptero *E. postvittana*, los autores concluyeron que diferentes cantidades de ARNdc resultaban en una diferente eficacia del silenciamiento (Turner *et al.*, 2006) por lo que podemos especular que la falta de respuesta obtenida en nuestro estudio podría ser debido a la utilización de una cantidad de ARNdc insuficiente. Otros factores que han sido descritos como intrínsecos de los genes diana y que podrían ser la causa de los fracasos en los experimentos de RNAi son la degradación del ARNdc utilizado y la estabilidad o el recambio del ARNm diana, ya que los genes podrían aumentar sus niveles de transcripción en respuesta a la degradación del ARNm producida por el ARNdc (Bellés, 2010; Terenius *et al.*, 2011). En nuestro caso, solo podemos afirmar que las cantidades de ARNdc que proporcionamos a las larvas (hasta 1,2 µg por larva o una semana seguida alimentándose con bacterias que expresan ARNdc) no han sido suficientes para silenciar *onapn1* y *onapn2*.

Como consecuencia, la función de estas APN en el mecanismo de toxicidad de las toxinas Cry *in vivo* en *O. nubilalis*, no ha sido dilucidada.



CONCLUSIONS

- ✚ Mortality bioassays showed that *O. nubilalis* larvae are highly susceptible to Cry proteins from class 1A and moderately susceptible to Cry proteins from class 2. Among class 1A, the most toxic Cry protein is Cry1Ac, followed by Cry1Ab and Cry1Aa.
- ✚ The pressure of selection exerted by repeated spraying of Bt formulations in a close environment like a greenhouse during the whole growing season, did not drive to resistant *O. nubilalis* individuals apparition. Comparison of the greenhouse-collected population and a laboratory strain, evidenced population variability with regard the susceptibility to different Cry toxins.
- ✚ Low levels of resistance to the Cry1Ab protein may be quickly selected in *O. nubilalis*; nevertheless they are not enough for surviving to high doses of toxin.
- ✚ Tolerance to Cry1Ab in Spanish *O. nubilalis* populations is controlled by more than one *locus*. Upper limit for heritability of tolerance was estimated to be comprised between 0.82 and 0.90, suggesting that a high proportion of phenotypic variation was due to genetic differences. Cadherin could be one of the genes involved in Cry1Ab tolerance.
- ✚ Binding of Cry1Ab toxin to the midgut epithelium of *O. nubilalis* differs from Cry1F binding. Cry1Ab binding is unaffected by Cry1Ab, Cry1F, lectins or sugars pre-incubations, whereas Cry1F binding is blocked by Cry1F, Cry1Ab or sialic acid.
- ✚ We have characterized *OnAPN* transcripts belonging to classes 1 – 4 and 8. The definition of the *OnAPN8* added a new class to the lepidopteran APN gene family that now consists of at least eight members. Multiple isoforms belonging to the class 3 (*OnAPN3a* and *OnAPN3b*) are so far exclusive for *O. nubilalis*.
- ✚ The *onapn* genes are expressed in *O. nubilalis* larval midgut all along the larval development. The *onapn8* gene is also expressed, at the same level, in the Malpighian tubules.
- ✚ The *onpsa* gene expressed in the midgut of *O. nubilalis* is a different type of aminopeptidase than the lepidopteran APNs normally related with *B. thuringiensis*. It has no signal peptide and shows an ubiquitous expression.

- ✚ *OnAPN1*, *OnAPN2*, *OnAPN3a*, *OnAPN3b* and *OnAPN8* proteins have been expressed *ex vivo*. They are functionally different isoforms, with distinctive specificity of substrate and sensitivity to aminopeptidase inhibitors. *OnAPN3b* is a not functional isoform, under the conditions tested.
- ✚ Cell-expressed *OnAPNs* interact differentially with Cry1Ab and Cry1F toxins. *OnAPN1* protein binds to both Cry1Ab and Cry1AF toxins, whereas *OnAPN3a* and *OnAPN8* only interact with Cry1F. *OnAPN2* and *OnAPN3b* do not interact with neither of these toxins. This result contributes to define the role of the APNs as receptors of Cry proteins in *O. nubilalis* and reinforces the binding model proposed for the Cry1Ab and Cry1F proteins.



BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkefi-Mesrati, L., Boukedi, H., Dammak-Karray, M., Sellami-Boudawara, T., Jaoua, S., *et al.* (2011). Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. *J.Invertebr.Pathol.* 106: 250 - 254.
- Adreadis, S. S., Alvarez-Alfageme, F., Sánchez-Ramos, I, Stodola, T. J., Andow, D. A., *et al.* (2007). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAb in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J.Econ.Entomol.* 100: 195 - 201.
- Agrawal, N., Malhotra, P., y Bhatnagar, R. K. (2002). Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Appl.Environmental Microbiology.* 68: 4583 - 4592.
- Akhurst, R., Lyness, E. W., Zhang, Q. Y., Cooper, D. J., y Pinnock, D. E. (1997). A 16S rRNA gene oligonucleotide probe for identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from sheep fleece. *J.Invertebr.Pathol.* 69: 24 - 30.
- Akhurst, R. J., James, W., Bird, L. J., y Beard, C. (2003). Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J.Econ.Entomol.* 96: 1290 - 1299.
- Alcantara, E.P., Aguda, R.M., Curtiss, A., Dean, D.H., y Cohen, M.B. (2004). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borers. *Arch Insect Biochem Physiol.* 55: 169 - 177.
- Alinia, F., Cohen, M. B., y Gould, F. (2000). Heritability of tolerance to Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J.Econ.Entomol.* 93: 14 - 17.
- Alstad, D. N. y Andow, D. A. (1996). Implementing resistance management of insect resistance to transgenic crops. *AgBiotech News Inf.* 8: 177 - 181.
- Alves, A. P., Spencer, T. A., Tabashnik, B. E., y Siegfried, B. D. (2006). Inheritance of resistance to the Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J.Econ.Entomol.* 99: 494 - 501.
- Ananda Kumar, P., Sharma, R.P., y Malik, R.S. (1996). The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. En: *Advances in applied microbiology.* Vol 42. Eds.: Neidleman, S. L., y Laskin, A. I. Academic press Inc, Elsevier.
- Andow, D. A. y Alstad, D. N. (1998). F₂ screen for rare resistance alleles. *J.Econ.Entomol.* 91: 572 - 578.

- Andow, D. A., Olson, D. M., Hellmich, R. L., Alstad, D. N., y Hutchison, W. D. (2000). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J.Econ.Entomol.* 93: 26 - 30.
- Angelucci, C., Barrett-Wilt, G. A., Hunt, D. F., Akhurst, R. J., East, P. D., *et al.* (2008). Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the delta-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 38: 685 - 696.
- Anilkumar, K. J., Pusztai-Carey, M., y Moar, W. J. (2008). Fitness costs associated with Cry1Ac-resistant *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): a factor countering selection for resistance to Bt cotton? *J.Econ.Entomol.* 101: 1421 - 1431.
- Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M., y Gómez, I. (2010). Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J.Biol.Chem.* 285: 12497 - 12503.
- Aronson, A. I., Geng, C., y Wu, L. (1999). Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl.Environ.Microbiol.* 65: 2503 - 2507.
- Atsumi, S., Miyamoto, K., Yamamoto, K., Narukawa, J., Kawai, S., *et al.* (2012). Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 109: 1591 – 1598.
- Ballester, V., Granero, F., Tabashnik, B. E., Malvar, T., y Ferré, J. (1999). Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl.Environ.Microbiol.* 65: 1413 - 1419.
- Banks, D. J., Jurat-Fuentes, J. L., Dean, D. H., y Adang, M. J. (2001). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa delta-endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not N-acetylgalactosamine mediated. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 31: 909 - 918.
- Banks, D. J., Hua, G., y Adang, M. J. (2003). Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 33: 499 - 508.
- Barton, K. A., Whiteley, H. R., y Yang, N. S. (1987). *Bacillus thuringiensis* section sign-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85: 1103 - 1109.

- Bates, S. L., Zhao, J. Z., Roush, R. T., y Shelton, A. M. (2005). Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat.Biotechnol.* 23: 57 - 62.
- Baxter, S. W., Zhao, J. Z., Gahan, L. J., Shelton, A. M., Tabashnik, B. E., *et al.* (2005). Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in *Plutella xylostella*. *Insect Mol.Biol.* 14: 327 - 334.
- Baxter, S. W., Zhao, J. Z., Shelton, A. M., Vogel, H., y Heckel, D. G. (2008). Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 38: 125 - 135.
- Baxter, S. W., Badenes-Pérez, F. R., Morrison, A., Vogel, H., Crickmore, N., *et al.* (2011). Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera. *Genetics* 189: 675 - 679.
- Bel, Y., y Escrache, B. (2006). Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes. *Gene* 381: 71 - 80.
- Bel, Y., Siqueira, H. A., Siegfried, B. D., Ferré, J., y Escrache, B. (2009). Variability in the cadherin gene in an *Ostrinia nubilalis* strain selected for Cry1Ab resistance. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 39: 218 - 223.
- Bel, Y., Ferré, J., y Escrache, B. (2011). Quantitative real-time PCR with SYBR Green detection to assess gene duplication in insects: study of gene dosage in *Drosophila melanogaster* (Diptera) and in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). *BMC Res. Notes.* 4: 84.
- Bellés, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annu.Rev.Entomol.* 55: 111 - 128.
- Bird, L. J., y Akhurst, R. J. (2004). Relative fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on conventional and transgenic cotton. *J.Econ.Entomol.* 97: 1699 - 1709.
- Bird, L. J., y Akhurst, R. J.(2005). Fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton with reduced levels of Cry1Ac. *J.Econ.Entomol.* 98: 1311 - 1319.
- Blanco, C. A., Andow, D. A., Abel, C. A., Sumerford, D. V., Hernández, G., *et al.* (2009). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance frequency in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J.Econ.Entomol.* 102: 381 - 387.
- Bond, R. P. M., Boyce, C. B. C., y French, S. J. (1969). A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Biochem. J.* 114: 477 - 488.

- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., y Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J.Mol.Biol.* 348: 363 - 382.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., y Lescar, J. (2006). Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J.Bacteriol.* 188: 3391 - 3401.
- Bourguet, D., Chaufaux, J., Seguin, M., Buisson, C., Hinton, J. L., *et al.* (2003). Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theor.Appl.Genet.* 106: 1225 - 1233.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248 - 254.
- Bradley, D., Harkey, M. A., Kim, M. K., Biever, K. D., y Bauer, L. S. (1995). The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J.Invertebr.Pathol.* 65: 162 - 173.
- Bravo, A., Gill, S. S., y Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423 - 435.
- Bravo, A., y Soberón, M. (2008). How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26: 573 - 579.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., y Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 41: 423 - 431.
- Brévault, T., Prudent, P., Vaissayre, M., y Carriere, Y. (2009). Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry2Ab2 insecticidal proteins in four countries of the West African cotton belt. *J.Econ.Entomol.* 102: 2301 - 2309.
- Brookes, G., y Barfoot, P. (2010). Global impact of biotech crops: environmental effects, 1996-2008. *Agbioforum* 13: 76 - 94.
- Budatha, M., Meur, G., y Dutta-Gupta, A. (2007a). A novel aminopeptidase in the fat body of the moth *Achaea janata* as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and its comparison with midgut aminopeptidase. *Biochem.J.* 405: 287 - 297.
- Budatha, M., Meur, G., Kirti, P. B., y Dutta-Gupta A. (2007b). Characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry toxin binding novel GPI anchored

- aminopeptidase from fat body of the moth *Spodoptera litura*. *Biotechnol.Lett.* 29: 1651 - 1657.
- Bull, J. J., Vogt, R. C., y Bulmer, M. G. (1982) Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. *Evolution.* 36: 333 – 341.
- Butko, P. (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl.Environ.Microbiol.* 69: 2415 - 2422.
- Caccia, S., Hernández -Rodríguez, C. S., Mahon, R. J., Downes, S., James, W., *et al.* (2010). Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. *PLoS One.* 5: e9975.
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villasenor, R., Pacheco, S., Porta, H., *et al.* (2010). The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 40: 58 - 63.
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., y Bulla, L. A., Jr.(2003). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Mol.Cell Proteomics.* 2: 19 - 28.
- Chambers, J. A., Jelen, A., Gilbert, M. P., Jany, C. S., Johnson, T. B., *et al.* (1991). Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *J.Bacteriol.* 173: 3966 - 3976.
- Chandrashekar, K., y Gujar, G. T.(2004). Development and mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin Cry1Ac in the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Indian J.Exp.Biol.* 42: 164 - 173.
- Chang, C., Yu, Y. M., Dai, S. M., Law, S. K., y Gill, S. S. (1993). High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl.Environ.Microbiol.* 59: 815 - 821.
- Chang, W. X., Gahan, L. J., Tabashnik, B. E., y Heckel, D. G.(1999). A new aminopeptidase from diamondback moth provides evidence for a gene duplication event in Lepidoptera. *Insect Mol.Biol.* 8: 171 - 177.
- Chaufaux, J., Seguin, M., Swanson, J. J., Bourguet, D., y Siegfried, B. D. (2001). Chronic exposure of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin. *J.Econ.Entomol.* 94: 1564 - 1570.
- Chen, J., Aimanova, K. G., Pan, S., y Gill, S. S. (2009). Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor

of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 39: 688 - 696.

- Chen, J., Tang, B., Chen, H., Yao, Q., Huang, X., *et al.* (2010a). Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS One.* 5: e10133.
- Chen, L. Z., Liang, G. M., Zhang, J., Wu, K. M., Guo, Y. Y., *et al.* (2010b). Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch.Insect Biochem.Physiol* 73: 61 - 73.
- Chen, X. J., Curtiss, A., Alcantara, E., y Dean, D. H. (1995). Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J.Biol.Chem.* 270: 6412 - 6419.
- Chougule, N. P., Giri, A. P., Sainani, M. N., y Gupta, V. S. (2005). Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 35: 355 - 367.
- Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J. A., y Gatehouse, A. M. (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Plant Sci.* 11: 302 - 308.
- Coates, B. S., Sumerford, D. V., Hellmich, R. L., y Lewis, L. C. (2005). Sequence variation in the cadherin gene of *Ostrinia nubilalis*: a tool for field monitoring. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 35: 129 - 139.
- Coates, B. S., Sumerford, D. V., Hellmich, R. L., y Lewis, L. C. (2008a). Mining an *Ostrinia nubilalis* midgut expressed sequence tag (EST) library for candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Insect Mol.Biol.* 17: 607 - 620.
- Coates, B. S., Sumerford, D. V., y Lewis, L. C. (2008b). Segregation of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, aminopeptidase 1, cadherin, and bre5-like alleles, from a colony resistant to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxins, are not associated with F₂ weights when fed a diet containing Cry1Ab. *Journal of Insect Science* 8:21.
- Coates, B. S., Sumerford, D. V., López, M. D., Wang, H., Fraser, L. M., *et al.* (2011). A single major QTL controls expression of larval Cry1F resistance trait in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) and is independent of midgut receptor genes. *Genetica* 139: 961 - 972.
- Cohen, S., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., *et al.* (2011). Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *J.Mol.Biol.* 413: 804 - 814.

- Crava, C. M., Bel, Y., Lee, S. F., Manachini, B., Heckel, D. G., *et al.* (2010). Study of the aminopeptidase N gene family in the lepidopterans *Ostrinia nubilalis* (Hübner) and *Bombyx mori* (L.): sequences, mapping and expression. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 40: 506 - 515.
- Crespo, A. L., Spencer, T. A., Alves, A. P., Hellmich, R. L., Blankenship, E. E., *et al.* (2009). On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Pest.Manag.Sci.* 65: 1071 - 1081.
- Crespo, A. L., Rodrigo-Simon, A., Siqueira, H. A., Pereira, E. J., Ferré, J., *et al.* (2011). Cross-resistance and mechanism of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J.Invertebr.Pathol.* 107: 185 - 192.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., *et al.* (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62: 807 - 813.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, *et al.* (2012). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/
- d'Alencon, E., Sezutzu, H., Legeai, F., Permal, E., Bernard-Samain, S., *et al.* (2010). Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107: 7680 - 7685.
- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J., y Jørgensen, K. (1996). Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett.Appl.Microbiol.* 23: 146 - 150.
- Dasgupta, S., Fernández, L., Kameyama, L., Inada, T., Nakamura, Y., *et al.* (1998). Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNaseIII-the effect of dsRNA binding on gene expression. *Molec.Microbiol.* 28: 629 - 640.
- de Barjac, H., y Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* type de *B. thuringiensis*. *Entomophaga* 1: 5 - 31.
- de Barjac, H., y Dedonder, R. (1965). Isolement d'un nucléotide identifiable à la "toxine thermostable" de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*. *C.R.Academy of Science, Paris* 260: 7050 - 7053.
- de Barjac, H., y Frachon, E. (1990). Classification of *Bacillus thuringiensis* strain. *Entomophaga* 35: 233 - 249.

- de Maagd, R. A., Kwa, M. S., van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., *et al.* (1996). Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1537 - 1543.
- de Maagd, R. A., Bosch, D., y Stiekema, W. (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 9 - 13.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17: 193 - 199.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., y Schnepf, H. E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409 - 433.
- Denolf, P., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D., y Van, Rie J. (1993). Two Different *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Receptors in the Midgut Brush Border Membrane of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1828 - 1837.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Van, Damme J., Jansens, S., Peferoen, M., *et al.* (1997). Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248: 748 - 761.
- Derbyshire, D. J., Ellar, D. J., y Li, J. (2001). Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57: 1938 - 1944.
- Dhurua, S., y Gujar, G. T. (2011). Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest. Manag. Sci.* 67: 898 - 903.
- Donovan, W.P., Tan, Y., Jany, C.S., y González, J.J.M. (1994). *Bacillus thuringiensis* CryEt4 and CryEt5 toxin genes and proteins toxic to lepidopteran species. USA Pat. n.: 5322687
- Donovan, W. P., Donovan, J. C., y Engleman, J. T. (2001). Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* 78: 45 - 51.

- Downes, S., Parker, T., y Mahon, R. (2010). Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton. PLoS One. 5: e12567.
- Dulmage, H. T (1970). Production of the spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J.Invertebr.Pathol. 16: 385 - 389.
- Emmerling, M., Chandler, D., y Sandeman, M. (2001). Molecular cloning of three cDNAs encoding aminopeptidases from the midgut of *Helicoverpa punctigera*, the Australian native budworm. Insect Biochem.Mol.Biol. 31: 899 - 907.
- Engels, H., Bourguet, D., Cagan, L., Manachini, B., Schuphan, I., et al. (2010). Evaluating resistance to Bt toxin Cry1Ab by F₂ screen in European populations of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). J.Econ.Entomol. 103: 1803 - 1809.
- Estada, U., y Ferré, J. (1994). Binding of Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* to the Midgut Brush Border of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), and Selection for Resistance to One of the Crystal Proteins. Appl.Environ.Microbiol. 60: 3840 - 3846.
- Estela, A., Escriche, B., y Ferré, J. (2004). Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Appl.Environ.Microbiol. 70: 1378 - 1384.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., et al. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93: 5389 - 5394.
- Fabrick, J. A., Kanost, M. R., y Baker, J. E. (2004). RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxygenase in the Pyralid moth, *Plodia interpunctella*. J.Insect Sci. 4: 15.
- Fabrick, J. A., Tabashnik, B. E.(2007). Binding of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm. Insect Biochem.Mol.Biol. 37: 97 - 106.
- Falconer, D. S., Mackay, T. F. (1996). Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Longman.
- Fang, Y., Li, Z., Liu, J., Shu, C., Wang, X., et al. (2011). A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. J.Genet.Genomics 38: 567 - 576.

- Farinós, G. P., de la Poza, M., Hernández -Crespo, P., Ortego, F., y Castañera, P. (2004). Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagroides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomol.Exp.Appl.* 110: 23 - 30.
- Fearing, P. L., Brown, D., Vlachos, D., Menghji, M., y Privalle, L. (1997). Quantitative analysis of CryIA(b) expression in Bt maize plants, tissues, and silage and stability of expression over successive generations. *Mol.Breeding* 3: 169 - 176.
- Federici, B. A., Park, H. W., Bideshi, D. K., Wirth, M. C., y Johnson, J. J. (2003). Recombinant bacteria for mosquito control. *J.Exp.Biol.* 206: 3877 - 3885.
- Ferré, J., Real, M. D., Van, Rie J., Jansens, S., y Peferoen, M. (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88: 5119 - 5123.
- Ferré, J., y Van Rie, J. (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu.Rev.Entomol.* 47: 501 - 533.
- Ferré, J., Van Rie, J., y MacIntosh, S.C., (2008). Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). En: *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs*, Eds.: Romeis, J., Shelton, A. M., y Kennedy. G. C. Springer Science + Business Media B.V.
- Finney, D. J. (1971). *Probit analysis*. Cambridge University Press.
- Firko, M. J. y Hayes, J. L. (1990). Quantitative genetics tools for insecticide resistance risk assessment: estimating the heritability of resistance. *J.Econ.Entomol.* 83: 647 - 654.
- Fischhoff, D. A, Bowdisch, K. S, Perlak, F. J, Marrone, P. G, McCormic, *et al.* (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. *BioTechnology* 5: 807 - 813.
- Flannagan, R. D., Yu, C. G., Mathis, J. P., Meyer, T. E., Shi, X., *et al.* (2005). Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem.Mol.Biol.* 35: 33 - 40.
- Folcher, L., Delos, M., Marengue, E., Jarry, M., Weissenberger, A., *et al.* (2010). Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agron.Sustain.Dev.* 30: 711 - 719.
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M. D., y Martínez, R. (1996). Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one

- susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. Arch.Insect Biochem.Physiol 31: 257 - 272.
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M. D., Tato, A., y Martínez, R. (1999). Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. Arch.Insect Biochem.Physiol 42: 51 - 63.
- Franklin, M. T., Nieman, C. L., Janmaat, A. F., Soberón, M., Bravo, A., *et al.* (2009). Modified *Bacillus thuringiensis* toxins and a hybrid *B. thuringiensis* strain counter greenhouse-selected resistance in *Trichoplusia ni*. Appl.Environ.Microbiol. 75: 5739 - 5741.
- Frederiksen, K., Rosenquist, H., Jørgensen, K., y Wilcks, A. (2006). Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. Appl.Environ.Microbiol. 72: 3435 - 3440.
- Gahan, L. J., Gould, F., y Heckel, D. G. (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. Science 293: 857 - 860.
- Gahan, L. J., Ma, Y. T., Coble, M. L., Gould, F., Moar, W. J., *et al.* (2005). Genetic basis of resistance to Cry1Ac and Cry2Aa in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). J.Econ.Entomol. 98: 1357 - 1368.
- Gahan, L. J., Pauchet, Y., Vogel, H., y Heckel, D. G. (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. PLoS Genet. 6: e1001248.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., *et al.* (2001). Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr. 57: 1101 - 1109.
- Gao, Y., Wu, K., y Gould, F. (2009). Frequency of Bt resistance alleles in *H. armigera* during 2006-2008 in Northern China. Environ.Entomol. 38: 1336 - 1342.
- García Marí, F., Costa Comelles, J., y Ferragut Pérez, F. (1994). Plagas Agrícolas. 2nd ed. Phytoma España.
- Garczynski, S. F., y Adang, M. J. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) d-endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidyl inositol anchor. Insect Biochem.Mol.Biol. 25: 409 - 415.
- Garner, K. J., Hiremath, S., Lehtoma, K., y Valaitis, A. P. (1999). Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N

cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 29: 527 - 535.

- Gassmann, A. J., Carriere, Y., y Tabashnik, B. E. (2009). Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu.Rev.Entomol.* 54: 147 - 163.
- Gaviria Rivera, A. M., Granum, P. E., y Priest, F. G. (2000). Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol.Lett.* 190: 151 - 155.
- Gill, S. S., y Hornung, J. M. (1987). Cytolytic activity of *Bacillus thuringiensis* proteins to insect and mammalian cell lines. *J.Invertebr.Pathol.* 50: 16 - 25.
- Gómez, I., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A., y Soberón, M. (2001). Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J.Biol.Chem.* 276: 28906 - 28912.
- Gómez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., y Soberón, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513: 242 - 246.
- Gómez, I., Dean, D. H., Bravo, A., y Soberón, M. (2003). Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. *Biochemistry* 42: 10482 - 10489.
- Gómez, I., Arenas, I., Benítez, I., Miranda-Rios, J., Becerril, B., *et al.* (2006). Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J.Biol.Chem.* 281: 34032 - 34039.
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernández, L. E., Pérez, C., *et al.* (2007). Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28: 169 - 173.
- Gómez-Barbero, M., Berbel, J., y Rodríguez-Cerezo, E.(2008). BT corn in Spain - the performance of the EU's first GM crop. *Nat.Biotechnol.* 26: 384 - 386.
- González-Cabrera, J., Herrero, S., Sayyed, A. H., Escriche, B., Liu, Y. B., *et al.* (2001). Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Appl.EnvIRON.Microbiol.* 67: 4610 - 4613.

- González-Cabrera, J., Escriche, B., Tabashnik, B. E., y Ferré, J. (2003). Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochem.Mol.Biol.* 33: 929 - 935.
- González-Cabrera, J., Farinós, G.P., Caccia, S., Díaz-Mendoza, M., Castañera, P., *et al.* (2006). Toxicity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). *Appl Environ Microbiol.* 72: 2594- 2600.
- González-Nuñez, M., Ortego, F., y Castañera, P. (2000). Susceptibility of Spanish populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J.Econ.Entomol.* 93: 459 - 463.
- Gouffon, C., Van, Vliet A., Van, Rie J., Jansens, S., y Jurat-Fuentes, J. L. (2011). Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. *Appl.Environ.Microbiol.* 77: 3182 - 3188.
- Gould, F., Martínez-Ramírez, A., Anderson, A., Ferré, J., Silva, F. J., *et al.* (1992). Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89: 7986 - 7990.
- Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D. G., *et al.* (1997). Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 3519 - 3523.
- Gould, F. (1998). Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu.Rev.Entomol.* 43: 701 - 726.
- Grace, J. K., y Ewart, D. M. (1996). Recombinant cells of *Pseudomonas fluorescens*: a highly palatable encapsulation for delivery of genetically engineered toxins to subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Lett.Appl.Microbiol.* 23: 183 - 186.
- Granum, P. E., y Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol.Lett.* 157: 223 - 228.
- Griebler, M., Westerlund, S. A., Hoffmann, K. H., y Meyering-Vos, M. (2008). RNA interference with the allatregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *J.Insect Physiol* 54: 997 - 1007.
- Griffitts, J. S. y Aroian, R. V. (2005). Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* 27: 614 - 624.

- Griko, N. B., Rose-Young, L., Zhang, X., Carpenter, L., Candas, M., *et al.* (2007). Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R₁. *Biochemistry* 46: 10001 - 10007.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., *et al.* (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J.Mol.Biol.* 254: 447 - 464.
- Guereca, L., y Bravo, A.(1999). The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochim.Biophys.Acta* 1429: 342 - 350.
- Gunning, R. V, Dang, H. T, Kemp, F. C, Nicholson, I. C, y Moores, G. D. (2005). New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl.Environ.Microbiol.* 71: 2558 - 2563.
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, *et al.* (2009a). Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J.Struct.Biol.* 168: 259 - 266.
- Guo, S., Zhang, Y., Song, F., Zhang, J., y Huang, D. (2009b). Protease-resistant core form of *Bacillus thuringiensis* Cry11e: monomeric and oligomeric forms in solution. *Biotechnol.Lett.* 31: 1769 - 1774.
- Hansen, B. M., y Hendriksen, N. B. (2001). Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl.Environ.Microbiol.* 67: 185 - 189.
- Hartl, D. L., y Clark, A. G.(1989). Principles of population genetics. 2nd ed. Sinauer Associates Inc.
- He, D. J., Shen, J. L., Zhou, W. L., y Gao, C. F. (2001). Using F₂ genetic method of isofemale lines to detect the frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin from transgenic Bt cotton in cotton bollworm (Lepidoptera:Noctuidae). *Cotton Sci.* 13: 105 - 108.
- He, K., Wang, Z., Wen, L., Bai, S., Ma, X., *et al.* (2005). Determination of baseline susceptibility to Cry1Ab protein for Asian corn borer (Lep., Crambidae). *J.Appl.Entomol.* 129: 407 - 412.
- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Gould, F. L., y Anderson, A.(1997). Identification of a linkage group with a major effect on resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J.Econ.Entomol.* 90: 75 - 86.

- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Baxter, S. W., Zhao, J. Z., Shelton, A. M., *et al.* (2007). The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J.Invertebr.Pathol.* 95: 192 - 197.
- Helgason, E., Økstad, O. A., Caugant, D., Johansen, H. A., Fouet, A., *et al.* (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One species on the basis of genetic evidence. *Appl.Enviro.Microbiol.* 66: 2627 - 2630.
- Hernández, C. S., Ferré, J., y Larget-Thiéry, I. (2001). Update on the detection of b-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis. *J.Appl.Microbiol.* 90: 643 - 647.
- Hernández, C.S., y Ferré. J. (2005) Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua*. *Appl Environ Microbiol.* 71: 5627 - 9.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Van Vliet, A., Bautsoens, N., Van Rie, J., y Ferré, J. (2008). Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species. *Appl Environ Microbiol.* 74: 7654 - 7659.
- Hernández-Martínez, P., Ferré, J., y Escriche, B. (2008). Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J.Invertebr.Pathol.* 97: 245 - 250.
- Hernández-Martínez, P., Ferré, J., y Escriche, B. (2009). Broad-spectrum cross resistance Broad-spectrum cross-resistance in *Spodoptera exigua* from selection with a marginally toxic Cry protein. *Pest. Manag. Sci.* 65: 645 - 650.
- Hernández-Martínez, P., Navarro-Cerrillo, G., Caccia, S., de Maagd, R. A., Moar, W. J., *et al.* (2010). Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. *PLoS.One.* 5:
- Herrero, S., Oppert, B., y Ferré, J. (2001). Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl.Enviro.Microbiol.* 67: 1085 - 1089.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Tabashnik, B.E., y Ferré J. (2001). Shared binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl Environ Microbiol.* 67: 5729 - 5734.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Ferré, J., Bakker, P. L., y de Maagd, R. A. (2004). Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem.J.* 384: 507 - 513.

- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P. L., Moar, W. J., y de Maagd, R. A. (2005). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. BMC.Genomics 6: 96.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., et al. (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 85: 7844 - 7848.
- Höfte, H., y Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol.Rev. 53: 242 - 255.
- Hooper, N. M. (1994). Families of zinc metalloproteases. FEBS Lett. 354: 1 - 6.
- Hossain, D. M., Shitomi, Y., Moriyama, K., Higuchi, M., Hayakawa, T., et al. (2004). Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. Appl.Environ.Microbiol. 70: 4604 - 4612.
- Hua, G., Masson, L., Jurat-Fuentes, J. L., Schwab, G., y Adang, M. J. (2001). Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. Appl.Environ.Microbiol. 67: 872 - 879.
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L., y Adang, M. J. (2004). Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. J.Biol.Chem. 279: 28051 - 28056.
- Huang, F., Higgins, R. A., y Buschman, L. L. (1997). Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera; Pyralidae). J.Econ.Entomol. 90: 1137 - 1143.
- Huang, F., Buschman, L. L., Higgins, R. A., y McGaughey, W. H. (1999a). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. Science 284: 965 - 967.
- Huang, F., Higgins, R. A., y Buschman, L. L. (1999b). Heritability and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera; Pyralidae). Bull.Entomol.Res. 89: 449 - 454.
- Huang, F., Zhu, K. Y., Buschman, L. L., Higgins, R. A., y Oppert, B. (1999c). Comparison of midgut proteinases in *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Pest.Biochem.Physiol. 65: 132 - 139.

- Huang, F., Buschman, L. L., y Higgins, R. A. (1999d). Susceptibility of different instars of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis*. J.Econ.Entomol. 92: 547 - 550.
- Huang, F., Buschman, L. L., Higgins, R. A., y Li, H. (2002). Survival of Kansas Dipel-resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt and non-Bt corn hybrids. J.Econ.Entomol. 95: 614 - 621.
- Huang, F., D.A. Andow, y Buschman, L.L. (2011). Success of the high dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. Entom. Exp. App. 140: 1-16.
- Husz, B. (1930). Field Experiments on the Application of *Bacillus thuringiensis* against the Corn Borer. Internat.Corn Borer Invest.Sci.Rep. 3: 91 - 93.
- Hutchison, W. D., Burkness, E. C., Mitchell, P. D., Moon, R. D., Leslie, T. W., et al. (2010). Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. Science 330: 222 - 225.
- Huvenne, H., y Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. J.Insect Physiol 56: 227 - 235.
- Hwang, J., y Kim, Y. (2011). RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. J.Invertebr.Pathol. 108: 194 - 200.
- Ibiza-Palacios, M. S., Ferré, J., Higurashi, S., Miyamoto, K., Sato, R., et al. (2008). Selective inhibition of binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to cadherin-like and aminopeptidase proteins in brush-border membranes and dissociated epithelial cells from *Bombyx mori*. Biochem.J. 409: 215 - 221.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., y Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. Bioeng.Bugs. 1: 31 - 50.
- Ihara, H., Kuroda, E., Wadano, A., y Himeno, M. (1993). Specific Toxicity of δ -Endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. Biosci.Biotechnol.Biochem. 57: 200 - 204.
- Ihara, H., y Himeno, M. (2008). Study of the irreversible binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut. J.Invertebr.Pathol. 98: 177 - 183.
- Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. Biol.Pharm.Bull. 25: 409 - 417.
- IRAC (2012). Insecticide Resistance Action Committee. <http://www.irc-online.org/about/resistance/>

- Iracheta, M. M., Pereyra-Alferez, B., Galan-Wong, L., y Ferré, J. (2000). Screening for *Bacillus thuringiensis* crystal proteins active against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J.Invertebr.Pathol.* 76: 70 - 75.
- Jalali, S. K., Lalitha, Y., Kamath, S. P., Mohan, K. S., y Head, G. P. (2010). Baseline sensitivity of lepidopteran corn pests in India to Cry1Ab insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Pest.Manag.Sci.* 66: 809 - 815.
- James, C. (2011). Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Brief 43. ISAAA
- Janmaat, A. F., y Myers, J. (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc.Biol.Sci.* 270: 2263 - 2270.
- Janmaat, A. F., Wang, P., Kain, W., Zhao, J. Z., y Myers, J. (2004). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *Trichoplusia ni*. *Appl.Environ.Microbiol.* 70: 5859 - 5867.
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Almazo, J. Y., *et al.* (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *J.Biol.Chem.* 282: 21222 - 21229.
- Joung, K. B., Lemarie, S., y Côté, J. C. (2001). Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* serovars revealed by RFLP using random DNA probes. *J.Basic Microbiol.* 41: 85 - 95.
- Jurat-Fuentes, J. L., Gould, F. L., y Adang, M. J. (2002). Altered Glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Appl.Environ.Microbiol.* 68: 5711 - 5717.
- Jurat-Fuentes, J. L., Gould, F. L., y Adang, M. J. (2003). Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. *Appl.Environ.Microbiol.* 69: 5898 - 5906.
- Jurat-Fuentes, J. L., y Adang, M. J. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur.J.Biochem.* 271: 3127 - 3135.
- Jurat-Fuentes, J. L., y Adang, M. J. (2006a). Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J.Invertebr.Pathol.* 92: 166 - 171.

- Jurat-Fuentes, J. L., y Adang, M. J. (2006b). The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. *Biochemistry* 45: 9688 - 9695.
- Jurat-Fuentes, J. L., Karumbaiah, L., Jakka, S. R., Ning, C., Liu, C., *et al.* (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One*. 6: e17606.
- Jurat-Fuentes, J.L. y Jackson, T., (2012). Bacterial Entomopathogens. En: *Insect Pathology*, 2nd edition. Eds.: Kaya, H., y Vera, F.. Elsevier.
- Kaur, P., y Dilawari, V. K. (2011). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from India. *Pest.Manag.Sci.* 67: 1294 - 1302.
- Khajuria, C., Zhu, Y. C., Chen, M. S., Buschman, L. L., Higgins, R. A., *et al.* (2009). Expressed sequence tags from larval gut of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*): exploring candidate genes potentially involved in *Bacillus thuringiensis* toxicity and resistance. *BMC.Genomics* 10: 286.
- Khajuria, C., Buschman, L. L., Chen, M. S., Muthukrishnan, S., y Zhu, K. Y. (2010). A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 40: 621 - 629.
- Khajuria, C., Buschman, L. L., Chen, M. S., Siegfried, B. D., y Zhu, K. Y. (2011). Identification of a Novel Aminopeptidase P-Like Gene (OnAPP) Possibly Involved in Bt Toxicity and Resistance in a Major Corn Pest (*Ostrinia nubilalis*). *PLoS One*. 6: e23983.
- Kitami, M., Kadotani, T., Nakanishi, K., Atsumi, S., Higurashi, S., *et al.* (2011). *Bacillus thuringiensis* Cry toxins bound specifically to various proteins via domain III, which had a galactose-binding domain-like fold. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 75: 305 - 312.
- Knight, P. J., Crickmore, N., y Ellar, D. J. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol.Microbiol.* 11: 429 - 436.
- Knowles, B. H., Knight, P. J., y Ellar, D. J. (1991). N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc.Biol.Sci.* 245: 31 - 35.

- Kolstø, A. B., Tourasse, N. J., y Økstad, O. A. (2009). What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species. *Annu.Rev.Microbiol.* 63: 451 - 476.
- Kranthi, K. R., Dhawad, C. S., Naidu, S. R., Mate, K., Behere, G. T., *et al.* (2006). Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hubner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Crop Prot.* 25: 119 - 124.
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J. L., McNall, R. J., Andacht, T., y Adang, M. J.(2007). Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 37: 189 - 201.
- Kronstad, J. W., Schnepf, E., y Whiteley, H. R. (1983). Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J.Bacteriol.* 154: 419 - 428.
- Kruger, M., Van Rensburg, J. B. J., y Van Der Berg, J. (2011a). Resistance to Bt maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa. *Environ.Entomol.* 40: 477 - 483.
- Kruger, M., Van Rensburg, J. B. J., y Van Der Berg, J. (2011b). Transgenic Bt maize: farmers' perceptions, refuge compliance and reports of stem borer resistance in South Africa. *J.Appl.Entomol.*
- Kumar, M., Gupta, G. P., y Rajam, M. V. (2009). Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *J.Insect Physiol* 55: 273 - 278.
- Lambert, B., Höfte, H., Annys, K., Jansens, S., Soetaert, P., *et al.* (1992). Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl.Environ.Microbiol.* 58: 2536 - 2542.
- Lande, R. (1981). The number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* 99: 541 - 553.
- Lara, P., Ortego, F., González-Hidalgo, E., Castañera, P., Carbonero, P., *et al.* (2000). Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 9: 169 - 178.
- Lecadet, M. M., Frachon, E., Cosmao Dumanoir, V., Ripouteau, H., Hamon, S., *et al.* (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J.Appl.Microbiol.* 86: 660 - 672.
- Lee, M. K., Miles, P., y Chen, J. S. (2006). Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 339: 1043 - 1047.

- Lee, M. K., Milne, R. E., Ge, A. Z., y Dean, D. H. (1992). Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *J.Biol.Chem.* 267: 3115 - 3121.
- Lee, M. K., Rajamohan, F., Gould, F., y Dean, D. H. (1995). Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl.Environ.Microbiol.* 61: 3836 - 3842.
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N., y Chen, J. S. (2003). The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl.Environ.Microbiol.* 69: 4648 - 4657.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salameitou, S., y Gominet, M. (2000). Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int.J.Med.Microbiol.* 290: 295 - 299.
- Leuber, M., Orlik, F., Schiffler, B., Sickmann, A., y Benz, R. (2006). Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: evidence for oligomer and channel formation. *Biochemistry* 45: 283 - 288.
- Levinson, B. L., Kasyan, K. J., Chiu, S. S., Currier, T. S., y González, J. J. M. (1990). Identification of δ -exotoxin production, plasmids encoding δ -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J.Bacteriol.* 172: 3172 - 3179.
- Li, H., González-Cabrera, J., Oppert, B., Ferré, J., Higgins, R. A., *et al.* (2004a). Binding analyses of Cry1Ab and Cry1Ac with membrane vesicles from *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 323: 52 - 57.
- Li, H., Oppert, B., Higgins, R. A., Huang, F., Zhu, K. Y., *et al.* (2004b). Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem.Mol.Biol.* 34: 753 - 762.
- Li, H., Oppert, B., Higgins, R. A., Huang, F., Buschman, L. L., *et al.* (2005). Susceptibility of dipel-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to individual *Bacillus thuringiensis* protoxins. *J.Econ.Entomol.* 98: 1333 - 1340.
- Li, J. D., Carroll, J., y Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815 - 821.

- Li, J., Koni, P. A., y Ellar, D. J. (1996). Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J.Mol.Biol.* 257: 129 - 152.
- Li, J., Derbyshire, D. J., Promdonkoy, B., y Ellar, D. J. (2001). Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem.Soc.Trans.* 29: 571 - 577.
- Li, X., Zhang, M., y Zhang, H. (2011). RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS One.* 6: e17788.
- Liang, Y., Patel, S. S., y Dean, D. H. (1995). Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J.Biol.Chem.* 270: 24719 - 24724.
- Liu, C., Gao, Y., Ning, C., Wu, K., Oppert, B., *et al.* (2010a). Antisera-mediated in vivo reduction of Cry1Ac toxicity in *Helicoverpa armigera*. *J.Insect Physiol* 56: 718 - 724.
- Liu, F., Xu, Z., Zhu, Y. C., Huang, F., Wang, Y., *et al.* (2010b). Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *Pest.Manag.Sci.* 66: 155 - 161.
- Liu, M., Cai, Q. X., Liu, H. Z., Zhang, B. H., Yan, J. P., *et al.* (2002). Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J.Appl.Microbiol.* 93: 374 - 379.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., y Pusztai-Carey, M.(1996). Field-Evolved Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIC in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J.Econ.Entomol.* 89: 798 - 804.
- Liu, Y., y Tabashnik, B. E. (1997). Inheritance of Resistance to the *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1C in the Diamondback Moth. *Appl.Enviro.Microbiol.* 63: 2218 - 2223.
- Lomate, P. R., y Hivrale, V. K. (2011). Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets. *Arthropod Plant Interact.* 5: 359 - 368.
- Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R., *et al.* (1997). The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 27: 735 - 743.

- Luo, K., McLachlin, J. R., Brown, M. R., y Adang, M. J. (1999). Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells. *Protein Expr.Purif.* 17: 113 - 122.
- Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R., *et al.* (2005). Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochem.Mol.Biol.* 35: 729 - 739.
- Mac Innes, T. C. y Bouwer, G. (2009). An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. *J.Invertebr.Pathol.* 101: 137 - 139.
- Mahon, R. J., Olsen, K. M., Downes, S., y Addison, S. (2007). Frequency of alleles conferring resistance to the Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J.Econ.Entomol.* 100: 1844 - 1853.
- Manachini, B. y Lozzia, C. L. (2003). Susceptibility of *Ostrinia nubilalis* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *B.Insectol.* 56: 215 - 219.
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., *et al.* (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat.Biotechnol.* 25: 1307 - 1313.
- Marçon, P. C., Young, L. J., Steffey, K. L., y Siegfried, B. D. (1999). Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera; Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J.Econ.Entomol.* 92: 279 - 285.
- Martínez-Ramírez, A. C., Gould, F., y Ferré, J. (1999). Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal dosages of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontr.Sci.Technol.* 9: 239 - 246.
- Masson, L., Lu, Y. J., Mazza, A., Brousseau, R., y Adang, M. J. (1995). The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J.Biol.Chem.* 270: 20309 - 20315.
- Masumoto, M., Yaginuma, T., y Niimi, T. (2009). Functional analysis of Ultrabithorax in the silkworm, *Bombyx mori*, using RNAi. *Dev.Genes Evol.* 219: 437 - 444.
- Maughan, H., y Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect.Genet.Evol.* 11: 789 - 797.

- McGaughey, W. H. (1985). Insect Resistance to the Biological Insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193 - 195.
- McNall, R. J., y Adang, M. J. (2003). Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 33: 999 - 1010.
- Meissle, M., Mouron, P., Musa, T., Bigler, F., Pons, X., *et al.* (2010). Pests, pesticide use and alternative options in european maize production: current status and future prospects. *J.Appl.Entomol.* 134: 357 - 375.
- Meissle, M., Romeis, J., y Bigler, F. (2011). Bt maize and integrated pest management-a European perspective. *Pest.Manag.Sci.* 67: 1049-1058.
- Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z., y Matthews, K. (2003). Are *Bt* crops safe? *Nat.Biotechnol.* 21: 1003 - 1009.
- Meng, F., Wu, K., Gao, X., Peng, Y., y Guo, Y. (2003). Geographic variation in susceptibility of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins in China. *J.Econ.Entomol.* 96: 1838 - 1842.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente 2012. <http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-/consejo-interministerial-de-ogms/superficie.aspx>
- Moar, W., Roush, R., Shelton, A., Ferré, J., MacIntosh, S., *et al.* (2008). Field-evolved resistance to Bt toxins. *Nat.Biotechnol.* 26: 1072 - 1074.
- Monnerat, R., Martins, E., Queiroz, P., Orduz, S., Jaramillo, G., *et al.* (2006). Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. *Appl.Enviro.Microbiol.* 72: 7029 - 7035.
- Morin, S., Biggs, W. B., Sisterson, M. S., Shriver, L., Eilers-Kirk, C., *et al.* (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 5004 - 5009.
- Morse, R. J., Yamamoto, T., y Stroud, R. M. (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9: 409 - 417.
- Muñoz-Garay, C., Sanchez, J., Darszon, A., de Maagd, R. A., Bakker, P., *et al.* (2006). Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different cry toxins. *J.Membr.Biol.* 212: 61 - 68.

- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., *et al.* (1998a). Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 62: 727 - 734.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Yamaguchi, F., Ogo, M., Kogure, M., *et al.* (1998b). Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 62: 718 - 726.
- Nakanishi, K., Yaoi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., *et al.* (2002). Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* -- their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Lett.* 519: 215 - 220.
- Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., y Givaudan, A. (2012). How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 220 - 231.
- Obata, F., Kitami, M., Inoue, Y., Atsumi, S., Yoshizawa, Y., *et al.* (2009). Analysis of the region for receptor binding and triggering of oligomerization on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *FEBS J.* 276: 5949 - 5959.
- Ogutcu, A., Suludere, Z., Uzunhisarcikli, M., y Kalender, Y. (2005). Effects of *Bacillus thuringiensis kurstaki* on Malpighian tubule cells of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) larvae. *Folia Biologica* 53: 7 - 11.
- Omer, A. D., Tabashnik, B. E., Johnson, M. W., y Leigh, T. F. (1993). Realized heritability of resistance to dicotophos in greenhouse whitefly. *Entomol.Exp.Appl.* 68: 211 - 217.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Johnson, D. E., MacIntosh, S. C., y McGaughey, W. H. (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 198: 940 - 947.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., y McGaughey, W. H. (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J.Biol.Chem.* 272: 23473 - 23476.
- Owen, D. B. (1962) Handbook of statistical tables. Addison-Wesley.
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez- Almazán, C., *et al.* (2009a). Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta*

aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J.Biol.Chem.* 284: 32750 - 32757.

- Pacheco, S., Gómez, I., Gill, S. S., Bravo, A., y Soberón, M. (2009b). Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. *Peptides* 30: 583 - 588.
- Pandian, G. N., Ishikawa, T., Vajaiyanthi, T., Hossain, D. M., Yamamoto, S., *et al.* (2010). Formation of macromolecule complex with *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins and chlorophyllide binding 252-kDa lipocalin-like protein locating on *Bombyx mori* midgut membrane. *J.Membr.Biol.* 237: 125 - 136.
- Pardo-López, L., Soberón, M., y Bravo, A. (2012). *Bacillus thuringiensis* insecticidal 3-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol.Rev.* doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x.:
- Pattanayak, D., Chakrabarti, S. K., Kumar, P. A., y Naik, P. S. (2001). Characterization of genetic diversity of some serovars of *Bacillus thuringiensis* by RAPD. *Indian J.Exp.Biol.* 39: 897 - 901.
- Peng, D., Xu, X., Ye, W., Yu, Z., y Sun, M. (2010). *Helicoverpa armigera* cadherin fragment enhances Cry1Ac insecticidal activity by facilitating toxin-oligomer formation. *Appl.Environ.Microbiol.* 85: 1033 - 1040.
- Pereira, E. J., Lang, B. A., Storer, N. P., y Siegfried, B. D. (2008). Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. *Entomol.Exp.Appl.* 126: 115 - 121.
- Pereira, E. J., Siqueira, H. A., Zhuang, M., Storer, N. P., y Siegfried, B. D. (2010). Measurements of Cry1F binding and activity of luminal gut proteases in susceptible and Cry1F resistant *Ostrinia nubilalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae). *J.Invertebr.Pathol.* 103: 1 - 7.
- Pérez, C., Fernández, L. E., Sun, J., Folch, J. L., Gill, S. S., *et al.* (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102: 18303 - 18308.
- Perlak, F. J, Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., y Fischhoff, D. A (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88: 3324 - 3328.

- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., y Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: e36.
- Pigott, C. R., y Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 71: 255 - 281.
- Quan, G. X., Kanda, T., y Tamura, T. (2002). Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. *Insect Mol.Biol.* 11: 217 - 222.
- Rahman, M. M., Roberts, H. L., Sarjan, M., Asgari, S., y Schmidt, O. (2004). Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 1696 - 1699.
- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., y Bhatnagar, R. K. (2002). Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J.Biol.Chem.* 277: 46849 - 46851
- Rajagopal, R., Agrawal, N., Selvapandiyam, A., Sivakumar, S., Ahmad, S., *et al.* (2003). Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Biochem.J.* 370: 971 - 978.
- Rajagopal, R., Arora, N., Sivakumar, S., Rao, N. G., Nimbalkar, S. A., *et al.* (2009). Resistance of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. *Biochem.J.* 419: 309 - 316..
- Ramírez-Suero, M., Valerio-Alfaro, G., Bernal, J. S., y Ramírez-Lepea, M. (2011). Synergistic effect of chitinases and *Bacillus thuringiensis israelensis* spore-toxin complex against *Aedes aegypti* larvae. *Can.Entomol.* 143: 157 - 164.
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., y Ravel, J. (2005). Genomics of *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol.Rev.* 29: 303 - 329.
- Reed, J. P., y Halliday, W. R. (2001). Establishment of Cry9C Susceptibility Baselines for European Corn Borer and Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *J.Econ.Entomol.* 94: 397 - 02.
- Rees, J. S., Jarrett, P., y Ellar, D. J. (2009). Peritrophic Membrane contribution to Bt Cry d-endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. *J.Invertebr.Pathol.* 100: 139 - 146.

- Reyes-Ramírez, A., y Ibarra, J. E. (2005). Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1346 - 1355.
- Rodrigo-Simón, A., de Maagd, R. A., Avilla, C., Bakker, P. L., Molthoff, J., *et al.* (2006). Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1595 - 1603.
- Roush, R. T. (1994). Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays? *Biocontrol Science and Technology* 4: 501 - 516.
- Saeglitz, C., Bartsch, D., Eber, S., Gathmann, A., Priesnitz, K. U., *et al.* (2006). Monitoring the Cry1Ab susceptibility of European corn borer in Germany. *J. Econ. Entomol.* 99: 1768 - 1773.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., y Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* 9: 283 - 300.
- Sanchis, V., y Bourguet, D. (2009). *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. En: *Sustainable agriculture*, Eds.: Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchere, V. y Alberola, C. EDP Sciences and Springer.
- Sayyed, A. H., Gatsi, R., Kouskoura, T., Wright, D. J., y Crickmore, N. (2001). Susceptibility of a field-derived, *Bacillus thuringiensis*-resistant strain of diamondback moth to in vitro-activated Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4372 - 4373.
- Sayyed, A. H., Gatsi, R., Ibiza-Palacios, M. S., Escriche, B., *et al.* (2005). Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6863 - 6869.
- Sayyed, A. H., Moores, G., Crickmore, N., y Wright, D. J. (2008). Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth. *Pest. Manag. Sci.* 64: 813 - 819.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., *et al.* (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775 - 806.

- Schulz, C., Perezgasga, L., y Fuller, M. T. (2001). Genetic analysis of dPsa, the *Drosophila* orthologue of puromycin-sensitive aminopeptidase, suggests redundancy of aminopeptidase. *Dev.Genes Evol.* 211: 581 - 588.
- Sekar, V., Held, B., Tippett, J., Amirhusin, B., Robeff, P., *et al.* (1997). Biochemical and molecular characterization of the insecticidal fragment of CryV. *Appl.Environ.Microbiol.* 63: 2798 - 2801.
- Sena, J. A., Hernández -Rodríguez, C. S., y Ferré, J. (2009). Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Appl.Environ.Microbiol.* 75: 2236 - 2237.
- Sergeev, N., Distler, M., Vargas, M., Chizhikov, V., *et al.* (2006). Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. *J.Microbiol.Methods* 65: 488 - 502.
- Shelton, A. M., Zhao, J. Z., y Roush, R. T. (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu.Rev.Entomol.* 47: 845 - 881.
- Siegfried, B. D., Marçon, P. C., Witkowski, J. F., Wright, R. J., y Warren, G. W. (1995). Susceptibility of Field Populations of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae), to *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *J.Agric.Entomol.* 12: 267 - 273.
- Siegfried, B. D., Zoerb, A. C., y Spencer, T. (2001). Development of European corn borer on event 176 Bt corn: influence on survival and fitness. *Entomol.Exp.Appl.* 100: 15 - 20.
- Siegfried, B. D., y Hellmich, R. L. (2012). Understanding successful resistance management: the European corn borer and Bt corn in the United States. *GM Crops Food.* 3:184 - 93.
- Simpson, R. M., y Newcomb, R. D. (2000). Binding of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins Cry1Ac and Cry1Ba to a 120-kDa aminopeptidase-N of *Epiphyas postvittana* purified from both brush border membrane vesicles and baculovirus-infected Sf9 cells. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 30: 1069 - 1078.
- Simpson, R. M., Poulton, J., y Markwick, N. P. (2008). Expression levels of aminopeptidase-N genes in the lightbrown apple moth, *Epiphyas postvittana*. *Insect Sci.* 15: 505 - 512.
- Sims, S. R. (1997). Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* protein. Effects on Lepidoptera, Diptera, and non-target arthropods. *Southwest.Entomol.* 22: 395 - 404.

- Singh, G., Sachdev, B., Sharma, N., Seth, R., y Bhatnagar, R. K. (2010). Interaction of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with ribosomal S2 protein triggers larvicidal activity in *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7202 - 7209.
- Siqueira, H. A., Moellenbeck, D., Spencer, T., y Siegfried, B. D. (2004). Cross-resistance of Cry1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *J. Econ. Entomol.* 97: 1049 - 1057.
- Siqueira, H. A., González-Cabrera, J., Ferré, J., Flannagan, R., y Siegfried, B. D. (2006). Analyses of Cry1Ab binding in resistant and susceptible strains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5318 - 5324.
- Sivakumar, S., Rajagopal, R., Venkatesh, G. R., Srivastava, A., y Bhatnagar, R. K. (2007). Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* 282: 7312 - 7319.
- Sjöström, H., Norén, O., y Olsen, J. (2000). Structure and function of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477: 25 - 34.
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B. E., *et al.* (2007). Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318: 1640 - 1642.
- Soufiane, B., y Côté, J. C. (2009). Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, gyrB and aroE gene sequence analyses. *Anton. Leeuw.* 95: 33 - 45.
- Stewart, G. S. A., Johnstone, K., Hagelberg, E., y Ellar, D. J. (1981). Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *Biochem. J.* 198: 101 - 106.
- Sthaly, D. P., Dingman, D. W., Bulla, L. A., y Aronson, A. I. (1978). Possible origin and function of the parasporal crystal in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 581 - 588.
- Stodola, T. J., Andow, D. A., Hyden, A. R., Hinton, J. L., Roark, J. J., *et al.* (2006). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in southern United States corn belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 99: 502 - 507.

- Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schröter, C., Thompson, M. W., *et al.* (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat.Immunol.* 1: 413 - 418.
- Storer, N. P., Babcock, J. M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G. D., *et al.* (2010). Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J.Econ.Entomol.* 103: 1031 - 1038.
- Swiecicka, I., Van der Auwera, G. A., y Mahillon, J. (2006). Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microb.Ecol.* 52: 544 - 551.
- Tabashnik, B. E., y Cushing, N. L. (1989). Quantitative genetics analysis of insecticide resistance: variation in fenvalerate tolerance in a diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) population. *J. Econ. Entomol.* 82: 5 - 10.
- Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N., y Johnson, M. W. (1990). Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J.Econ.Entomol.* 83: 1671 - 1676.
- Tabashnik, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu.Rev.Entomol.* 39: 47 - 79.
- Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Malvar, T., Heckel, D. G., Masson, L., *et al.* (1997). Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 12780 - 12785.
- Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Malvar, T., Heckel, D. G., Masson, L., *et al.* (1998). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.* 353: 1751 - 1756.
- Tabashnik, B. E., Gould, F., y Carriere, Y. (2004). Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. *J.Evol.Biol.* 17: 904 - 912.
- Tabashnik, B.E., y Carriere, Y. (2008). Evolution of insect resistance to transgenic plants. En: *Specialization, speciation and radiation. The evolutionary biology of herbivorous insects.*, Eds.: Tilmon, K. J.. University of California press.
- Tabashnik, B. E., Gassmann, A. J., Crowder, D. W., y Carriere, Y. (2008). Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat.Biotechnol.* 26: 199 - 202.

- Tabashnik, B. E., Van Rensburg, J. B., y Carriere, Y. (2009). Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *J.Econ.Entomol.* 102: 2011 - 2025.
- Tabashnik, B. E., Huang, F., Ghimire, M. N., Leonard, B. R., Siegfried, B. D., *et al.* (2011). Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nat.Biotechnol.* 29: 1128-1131.
- Taylor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., *et al.* (1992). Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol.Microbiol.* 6: 1211 - 1217.
- Takiff, H. E, Chen, S. M., y Court, D. L. (1989). Genetic analysis of the *rnc* operon of *E. coli*. *J.Bacteriol.* 171: 2581 - 2590.
- Tan, S. Y., Cayabyab, B. F, Alcantara, E., Ibrahim, Y. B., Huang, F., *et al.* (2011). Comparative susceptibility of *Ostrinia furnacalis*, *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Crop Prot.* 30: 1184 - 1189.
- Tate, C. D, Hellmich, R. L., y Lewis, L. C. (2006). Evaluation of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) neonate preferences for corn and weeds in corn. *J.Econ.Entomol.* 99: 1987 - 1993.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., *et al.* (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J.Insect Physiol* 57: 231 - 245.
- Terra, W. R., y Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 109: 1 - 62.
- Terra, W.R., y Ferreira, C. (2012). Biochemistry and molecular biology of digestion. En: *Insect molecular biology and biochemistry*, 1st edition. Eds.: Gilbert, L. I. Academic Press - Elsevier.
- Thomas, D. J., Morgan, J. A., Whipps, J. M., y Saunders, J. R. (2000). Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Appl.Environ.Microbiol.* 66: 118 - 124.
- Thomas, D. J., Morgan, J. A., Whipps, J. M., y Saunders, J. R. (2001). Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl.Environ.Microbiol.* 67: 330 - 338.

- Thomas, W. E., y Ellar, D. J. (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. J.Cell Sci. 60: 179 - 181.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D. G (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25: 4876 - 4882.
- Thompson, M. W., Tobler, A., Fontana, A., y Hersh, L. B. (1999). Cloning and analysis of the gene for the human puromycin-sensitive aminopeptidase. Biochem.Biophys.Res.Commun. 258: 234 - 240.
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., *et al.* (2009). Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. PLoS One. 4: e6225.
- Tiewisiri, K., y Wang, P. (2011). Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 108: 14037 - 14042.
- Timmons, L., Court, D. L., y Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Gene 263: 103 - 112.
- Tobler, A. R., Constam, D. B., Schmitt-Graff, A., Malipiero, U., Schlapbach, R., *et al.* (1997). Cloning of the human puromycin-sensitive aminopeptidase and evidence for expression in neurons. J.Neurochem. 68: 889 - 897.
- Trisyono, Y. A., y Chippendale, G. M. (2002). Susceptibility of field-collected populations of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*, to *Bacillus thuringiensis*. Pest.Manag.Sci. 58: 1022 - 1028.
- Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P., *et al.* (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. Insect Mol.Biol. 15: 383 - 391.
- Vachon, V., Laprade, R., y Schwartz J.L. (2012) Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. J Invertebr Pathol. 111: 1 – 12.
- Vadlamudi, R. K., Ji, T. H., y Bulla, L. A., Jr. (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. J.Biol.Chem. 268: 12334 - 12340.

- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., Ji, T. H., y Bulla, L. A., Jr. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J.Biol.Chem.* 270: 5490 - 5494.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., de Beuckeleer, M., *et al.* (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33 - 37.
- Valaitis, A. P., Jenkins, J. L., Lee, M. K., Dean, D. H., y Garner, K. J. (2001). Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Arch.Insect Biochem.Physiol* 46: 186 - 200.
- Valaitis, A. P. (2008). *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 38: 611 - 618.
- Valaitis, A. P. (2011). Localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin-binding molecules in gypsy moth larval gut sections using fluorescence microscopy. *J.Invertebr.Pathol.* 108: 69 - 75.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., y Van Mellaert, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur.J.Biochem.* 186: 239 - 247.
- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D., y Van, Mellaert H. (1990a). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl.Enviro.Microbiol.* 56: 1378 - 1385.
- Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D., y Van, Mellaert H. (1990b). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247: 72 - 74.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., y McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *In Vitro.* 13: 213 - 217.
- Velasco, P., Revilla, P., Monetti, L., Butrón, A., Ordás, A., *et al.* (2007). Corn borers (Lepidoptera: Noctuidae; Crambidae) in Northwestern Spain: population dynamics and distribution. *Maydica* 52: 195 - 203.
- Vié, V., Van Mau, N., Pomarède, P., Dance, C., Schwartz, J. L., *et al.* (2001). Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *J.Membr.Biol.* 180: 195 - 203.

- Vila, L., Quilis, J., Meynard, D., Breitler, J. C., Marfa, V., *et al.* (2005). Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnol.J.* 3: 187 - 202.
- Vlahovic, P., y Stefanovic, V. (1998). Kidney ectopeptidases. Structure, functions and clinical significance. *Pathol.Biol.(Paris)* 46: 779 - 786.
- Walters, F. S., deFontes, C. M., Hart, H., Warren, G. W., y Chen, J. S. (2010). Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab, an engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein. *Appl.Environ.Microbiol.* 76: 3082 - 3088.
- Wang, G., Wu, K., Liang, G., y Guo, Y. (2005a). Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. *Sci.China C.Life Sci.* 48: 346 - 356.
- Wang, P., Zhang, X., y Zhang, J. (2005b). Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 35: 611 - 620.
- Wang, P., Zhao, J. Z., Rodrigo-Simón, A., Kain, W., Janmaat, A. F., *et al.* (2007). Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl.Environ.Microbiol.* 73: 1199 - 1207.
- Warren, G.W. (1997). Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. En: *Advances in insect control, the role of transgenic plants*, Eds.: Carozzi, N. B., y Koziel, M.. Taylor & Francis Ltd.
- Whalon, M.E., y Wingerd, B.A. (2003) Bt: mode of action and use. *Arch Insect Biochem Physiol.* 54: 200 – 11.
- WHO (1999). Guideline Specification for Bacterial Larvicides for Public Health Use. Report of the WHO Informal Consultation. WHO, Geneva.
- Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F. V., *et al.* (1987). Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp Biochem.Physiol A: Physiol.* 86: 301 - 108.
- Wolfersberger, M. G. (1990). The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* 46: 475 - 477.

- Wu, X., Huang, F., Rogers Leonard, B., y Ottea, J. (2009). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein in the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). *J.Invertebr.Pathol.* 102: 44 - 9.
- Xia, Q., Cheng, D., Duan, J., Wang, G., Cheng, T., *et al.* (2007). Microarray-based gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Genome Biol.* 8: R162.
- Xie, R., Zhuang, M., Ross, L. S., Gómez, I., Oltean, D. I., *et al.* (2005). Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J.Biol.Chem.* 280: 8416 - 8425.
- Xu, X., Liangying, Y., y Wu, Y. (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl.Environ.Microbiol.* 71: 948 - 954.
- Xu, X., y Wu, Y. (2008). Disruption of Ha_BtR alters binding of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac to midgut BBMV of *Helicoverpa armigera*. *J.Invertebr.Pathol.* 97: 27 - 32.
- Xu, Z., Liu, F., Chen, J., Huang, F., Andow, D. A., *et al.* (2009). Using an F₂ screen to monitor frequency of resistance alleles to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest.Manag.Sci.* 65: 391 - 397.
- Yang, Y., Zhu, Y. C., Ottea, J., Husseneder, C., Leonard, B. R., *et al.* (2010). Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 40: 592 - 603.
- Yang, Y., Zhu, Y. C., Ottea, J., Husseneder, C., Leonard, B. R., *et al.* (2011). Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *PLoS.One.* 6: e25783 -
- Yu, C. G., Mullins, M. A., Warren, G. W., Koziel, M. G., y Estruch, J. J. (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl.Environ.Microbiol.* 63: 532 - 536.
- Yu, S. J. (2008). *The toxicology and biochemistry of insecticides.* Taylor and Francis Group.
- Zhang, S., Cheng, H., Gao, Y., Wang, G., Liang, G., *et al.* (2009). Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance

- to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 39: 421 - 429.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Rose-Young, L., y Bulla, L. A., Jr. (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death.Differ.* 12: 1407 - 1416.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., y Bulla, L. A., Jr. (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103: 9897 - 9902.
- Zhang, X., Griko, N. B., Corona, S. K., y Bulla, L. A., Jr. (2008). Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 149: 581 - 588.
- Zhuang, M., Oltean, D. I., Gómez, I., Pullikuth, A. K., Soberón, M., *et al.* (2002). *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J.Biol.Chem.* 277: 13863 - 13872.

ANEXOS

ANEXO I

Dieta artificial para la cría de *O. nubilalis*

Ingredientes	Cantidad
Agua	1 L
Agar	25 g
Harina de maíz	156 g
Germen de trigo	39,5 g
Levadura de cerveza	42,5 g
Ác. ascórbico	8,4 g
Ác. sórbico 99%	1,1 g
Ác. benzoico	2,8 g
Mezcla de vitaminas	0,06 g
Nipagina	1 g

Composición mezcla vitaminas

Vitamina	Cantidad (g)
Ác. nicotínico (Vit. B3)	2
Riboflavina (Vit. B2)	1
Tiamina (Vit. B1)	0,5
Piridoxina (Vit. B6)	0,5
Ác. fólico (Vit. B9)	2
Biotina (Vit. B8)	0,04
Ác.pantoténico (Vit. B5)	0,04

ANEXO II

Composición medio CCY

KH ₂ PO ₄ :	13 mM
K ₂ HPO ₄ :	26 mM
L-glutamina:	20 mg/l
Caseína:	1 g/l
Triptona:	1 g/l
Extracto de levadura:	0,4 g/l
Glicerol:	0,36 %

Composición sales CCY

ZnCl ₂ :	50 mM
MgCl ₂ ·6(H ₂ O):	500 mM
MnCl ₂ ·6(H ₂ O):	10 mM
CaCl ₂ ·2(H ₂ O):	200 mM
FeCl ₃ ·6(H ₂ O):	50 mM

Composición medio LB

Triptona:	10 g/l
Extracto de levadura:	5 g/l
NaCl:	10 g/l

Composición medio TB

KH ₂ PO ₄ :	17 mM
K ₂ HPO ₄ :	72 mM
Triptona:	10,8 g/l
Extracto de levadura:	21,6 g/l
Glicerol:	0,36 %

ANEXO III

Cebadores utilizados a lo largo de la tesis

Utilización	Nombre	Secuencia 5' → 3'
RACE PCR	Apn1_RACE5'	CGATATTGGCCTCACGCTGCTTGTA
	Apn1_RACE3'	ATTTCCGTGCTATGACGAACC
	Apn2_RACE5'	CAGCTTAGGGAACGCATAGG
	Apn2_RACE3'	CAGAAGCAACATGCCTTTGA
	Apn3a_RACE5'	CGCCCATGAAGTGTTCCATCAT
	Apn3a_RACE3'	GACTTACGAGGCTTCTAGT
	Apn3b_RACE5'	GCGTTAGGCCTAGCAATCAC
	Apn3b_RACE3'	GGCTCCAGGAAACCAGAAACAGCAA
	Apn4_RACE5'	CGCCCATGAAGTGTTCCATCAT
	Apn4_RACE3'	CAACGACAAGATTCGCTTCCACGAC
	Apn8_RACE5'	CTCCCAAAGCGTCAACTACC
	Apn8_RACE3'	CAAGAGGGTAGTTGACGCTTTGGGAGAC
	Psa_RACE5'	GTAAACACGTACAAGCACGCCATCTCTG
	Psa_RACE3'	CATGCCTGTCAGAGAGGAAAGGATTGAG
RT-PCR	Apn1_exp_L	TCTGCCTTCCCTGGTATTTG
	Apn1_exp_R	TCAGCACGAAATTGAAACCA
	Apn2_RACE5'	CAGCTTAGGGAACGCATAGG
	Apn2_RACE3'	CAGAAGCAACATGCCTTTGA
	Apn3a_seq_L	TGGTGCTATTCAATCTGGTCA
	Apn3a_RACE5'	CGCCCATGAAGTGTTCCATCAT
	Apn3b_RT_L	ATAGCGCAAACGTTCTCCTT
	Apn3b_RACE5'	GCGTTAGGCCTAGCAATCAC
	Apn4_exp_L	TGAAGACATGGCGTTCAGAC

	Apn4_RT_R	TCTGAGCCCTGTTGAGTTTG
	Apn8_exp_L	GCAAGCAGGCGTTGAGTA
	Apn8_exp_R	CTACCCTCTTGCCAAAGTCG
	PSA_exp_L	CGGCGTGTATAGTGTTTCGAC
	PSA_exp_R	CGCCAGCAGAGAAATCAGC
	S3_exp_L	CTGGCTGAGGATGGCTACTC
	S3_exp_R	GGAGCTTGCCAGACACTACC
qRT-PCR a tiempo real	Apn1_RT_L	TCAATTCGTGCTGAGAAGG
	Apn1_RT_R	ATCCCTCAGCTTCTGCAAGT
	Apn1_RNAi_RT_L	GGAGGATTCATTCCAGCAAA
	Apn1_RNAi_RT_R	GCAGATAGCGGTTCCAGAAG
	Apn2_RT_L	ATCTACGCTCCTCCTGGCTA
	Apn2_RT_R	TCTCAAAGGCATGTTGCTTC
	APN3a_RT_L	TGGTGCTATTCAATCTGGTCA
	APN3a_RT_R	CATGAAAGGAGCCAGTTGGT
	Apn3b_RT_L	ATAGCGCAAACGTTCTCCTT
	Apn3b_RT_R	CGCATCATATTCCAGGACAC
	Apn4_RT_L	TGACGACCATAACTGGGAAA
	Apn4_RT_R	TCTGAGCCCTGTTGAGTTTG
	Apn8_RT_L	CAGCTGAAGCTTGACCACAT
	Apn8_RT_R	TAACCAGACCCCAGTTCTCC
	PSA_RT_L	CAATGGAGAACTGGGGTCTT
	PSA_RT_R	GTGCTCTTCATCCACCAGA
	S3_RT_L	GAGCTACTGGGAGAGAAGG
S3_RT_R	GATGTTGAAACGCTTCTGGA	
Clonaje OnAPN	APN1_histag_L	GAAGATAATGGCACGCTCCT
	APN1_histag_R	GGATCCTTAATGATGATGATGATGACT

enteras para expresión		AATTAGATTAATAGAGACCTT
	APN2_histag_L	TCTAGAACGCGGGGATTGTATTTGTA
	APN2_histag_R	AAGCTTTTAATGATGATGATGATGATGGTG GTTGAAAATAGCAATAAAAACAG
	APN3a_histag_L	AATCAAAGATGGCGACTCTCA
	APN3a_histag_R	GGATCCTTAATGATGATGATGATGATGTAG CGCAAAGTTTGCAGCGGCAGCG
	APN3b_histag_L	TCTAGAAGCCTGAGTCGTGGAAGATG
	APN3b_histag_R	GGATCCTTAATGATGATGATGATGATGCAA GCAAGTTTGCAGCTACCGCG
	APN4_histag_L	GGATCCGCAGCTATGGGGTCAATCAT
	APN4_histag_R	TCTAGATTAATGATGATGATGATGATGACG GAGTAAGACAGTGGCCATCGCAG
	APN8_histag_L	GGATCCCATTAGCCATGTTCCGCCTA
APN8_histag_R	TCTAGACTAATGATGATGATGATGATGGTT GAGTCTCAAGACTGCCAAACAT	
Clonaje fragmentos <i>OnAPN</i> para ARNi	APN1_dsRNA1_L	ATCTGCCTTCCCTGGTATTTG
	APN1_drRNA1_R	TTAATAATATCCCTCAGC
	APN1_dsRNA2_L	TATATCTAGAAAGATTTACGACCGCACTT
	APN1_dsRNA2_R	TATACTGCAGTCAAGTTCTGGGGGAGTGAC
	APN2_dsRNA_L	CCCCTCTAGAAACGAGACGTCCCAAGTGA G
	APN2_dsRNA_R	CCCCCTGCAGAACAAGCCAGGATTCCACA G
EPIC-PCR	3.14L	CCTAGGCGAGGAGTCTAT
	3.14R	CGAGCCGTACTTCGTGATGGAGAG
Clonaje TBR	TBRp1_L	CCTCCAAGAGAGTTTTGAGC
	TBRp1_R	GATGACGTCGAACTCGAACA
	TBRp2_L	GAGCCACACAGAAGACGACA

TBRp2_R	CTGCTCAACGGTCTCAAGTTG
---------	-----------------------
