

## TESIS DE MÁSTER

Producción y evaluación de la actividad  
insecticida de nuevas proteínas de  
*Bacillus thuringiensis* contra áfidos y  
lepidópteros.

Saioa Legarrea Imízcoz

Curso 2011-12

Director: Dr. Iñigo Ruiz de Escudero  
Fuentemilla

El **Dr. Iñigo RUIZ DE ESCUDERO FUENTEMILLA**, Profesor Contratado Doctor del Área de Producción Vegetal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra,

## INFORMA

Que la presente memoria de Tesis de Master “Producción y evaluación de la actividad insecticida de nuevas proteínas de *Bacillus thuringiensis* contra áfidos y lepidópteros” elaborada por D<sup>a</sup> Saioa Legarrea Imízcoz ha sido realizada bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a doce de septiembre de 2012.



Dr. IÑIGO RUIZ DE ESCUDERO FUENTEMILLA

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera mostrar mi agradecimiento a Primitivo Caballero por su gran disposición y amabilidad cuando sugerí realizar este trabajo fin de máster en el grupo de investigación de Bioinsectidas Microbianos. También quiero mostrar mi agradecimiento a Iñigo, por haberme enseñado todo sobre *Bt* y gran cantidad de técnicas moleculares, siempre con rigor y paciencia, aunque tuvieras muchos otros temas de los que ocuparse. Muchas gracias a mis compañeras/os de laboratorio, por hacerme un hueco e incluirme en el día a día del laboratorio con tanta naturalidad. En especial, a Mireya y a Leo, compañeros de *Bt*, por vuestro apoyo en los experimentos. También quiero agradecer a Itxaso su ocupación en la cría de insectos, y a M<sup>a</sup>Jose, Oscar y Miriam que me ha permitido disponer de larvas y plantas siempre que lo he necesitado.

Quiero agradecer a mis compañeros del máster, Ernesto, Tana, Carlos Andrés, Carlos, Lili, María, Ana, Maite, Alberto, Andoni y Germán, el ambiente que hemos generado de compañerismo y diversión, que han hecho de este curso, un año muy especial. Finalmente, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres, su apoyo incondicional que me ha permitido realizar este trabajo y continuar en el camino de la investigación.

## INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. ABSTRACT</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. RESUMEN</b>   | <b>2</b>  |
| <b>3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b>  | <b>3</b>  |
| <b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | <b>9</b>  |
| 4.1. Búsqueda y selección de cepas portadoras de genes <i>cry9</i> mediante PCR         | 9         |
| 4.2. Clonaje de genes <i>cry9</i>   | 11        |
| 4.2.1. Amplificación completa de los genes <i>cry9</i>                                  | 11        |
| 4.2.2. Diseño de cebadores y análisis de secuencias                                     | 11        |
| 4.2.3. Clonaje de los productos de PCR  | 11        |
| 4.2.4. Clonaje de los genes <i>cry9</i> en el vector pET28b                             | 13        |
| 4.3. Producción de las proteínas Cry9   | 14        |
| 4.4. Evaluación de la toxicidad de las proteínas Cry9                                   | 15        |
| 4.4.1. Bioensayos con lepidópteros  | 15        |
| 4.4.2. Bioensayos con áfidos  | 16        |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | <b>17</b> |
| 5.1. Selección de cepas portadoras de genes <i>cry9</i>                                 | 17        |
| 5.2. Amplificación completa de los genes <i>cry9</i> y producción de las proteínas Cry9 | 20        |
| 5.3. Espectro de actividad frente a lepidópteros  | 22        |
| 5.4. Espectro de actividad frente a áfidos  | 25        |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>  | <b>28</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>29</b> |

## 1. ABSTRACT

The entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* is the leader of the biological insecticides used worldwide to control pests in agriculture, forestry, and mosquito vector of human diseases. In this work, we have performed a screening among some isolates available in the *B. thuringiensis* strain collection of the Microbial Bioinsecticides Group to select *cry9* genes. Cry9B, Cry9D and Cry9E proteins were successfully produced in recombinant bacteria to test insecticidal activity against six lepidopteran species of agricultural importance. All three proteins were toxic against *Mamestra brassicae*, *Ostrinia nubilalis* and *Chrysodeixis chalcites* using a diet surface contamination method. Although we are in an early stage to detect whether Cry9 proteins are toxic for aphids, the protein Vip3Ca3 showed insecticidal activity against the species *Myzus persicae*. These results provide promising information for the development of new bioinsecticides in the context of an Integrated Pest Management in agricultural crops.

## 2. RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) es el microorganismo más empleado en el mundo como agente de control biológico ya que produce proteínas con propiedades tóxicas para distintos invertebrados. En este trabajo se ha conseguido detectar una serie de genes *cry9* a partir de un conjunto de aislados de *B. thuringiensis* proveniente de la colección del grupo de Bioinsecticidas Microbianos. Las proteínas Cry9B, Cry9D y Cry9E fueron producidas con éxito en bacterias recombinantes para evaluar su actividad insecticida frente a seis especies de lepidópteros y el áfido *Myzus persicae*. Las tres proteínas resultaron tóxicas para las especies *Mamestra brassicae*, *Ostrinia nubilalis* y *Chrysodeixis chalcites* en ensayos realizados siguiendo la metodología de contaminación superficial de la dieta suministrada. Además de las proteínas Cry9, se ensayaron proteínas del grupo Vip3 contra *M. persicae*. La proteína Vip3Ca3 mostró actividad insecticida frente a dicha especie. Estos resultados proporcionan información básica para continuar progresando en el desarrollo de estrategias de lucha más eficientes para el control de plagas agrícolas.

### 3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria gram (+) anaeróbica facultativa y quimioorganotrofa, perteneciente al género Bacilaceae (Sneath, 1986). Se diferencia del resto de especies de este género porque produce uno o varios cuerpos cristalinos de naturaleza protéica, localizados en el citoplasma, asociados al proceso de esporulación y visibles a microscopio óptico de contraste de fases. Las proteínas que forman este cristal (Cry y Cyt) poseen propiedades tóxicas para varios órdenes de insectos, característica que le confiere a este microorganismo un papel relevante como bioinsecticida (de Maagd, 2001). Estos genes se expresan durante la fase estacionaria de crecimiento y su producto protéico forma la inclusión cristalina que puede llegar a constituir el 20-30% del peso seco de las células esporuladas (Schnepf *et al.*, 1998). Además, *B. thuringiensis* produce un tercer grupo de proteínas insecticidas durante su periodo vegetativo que son secretadas al medio, las proteínas Vip (Estruch *et al.*, 1996).

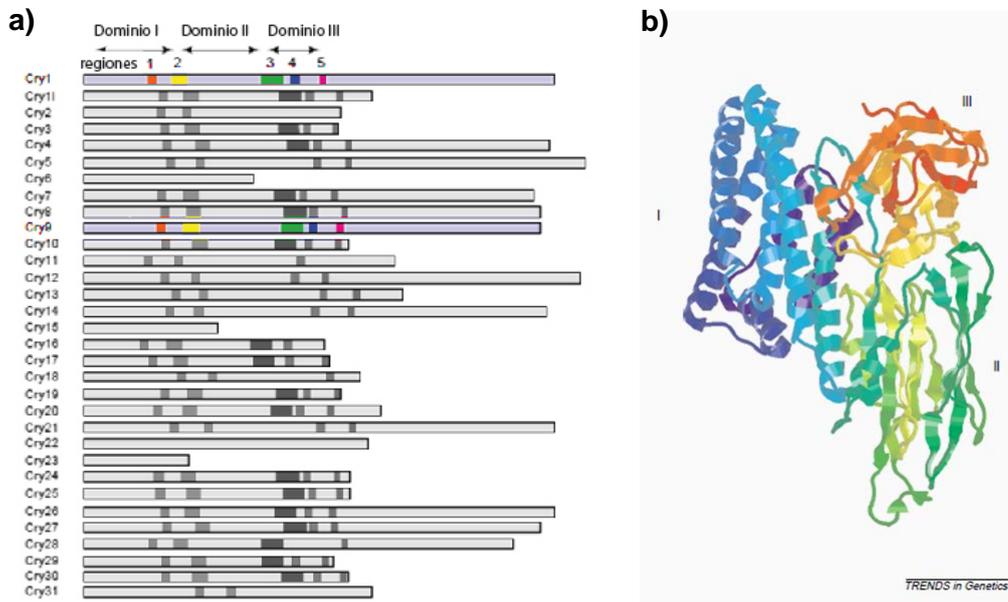
*Bacillus thuringiensis* fue aislada por primera vez a comienzos del siglo XX (Ishiwata, 1901) y en la actualidad se encuentra a la cabeza de los productos bioinsecticidas comercializados a nivel mundial para controlar plagas agrícolas, forestales y mosquitos vectores de enfermedades humanas como el dengue o la malaria. Además, desde hace algo más de 15 años, se ha conseguido producir proteínas insecticidas en plantas transgénicas, constituyendo los denominados “cultivos Bt”. Los genes codificantes de estas toxinas provienen de diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Crickmore, 2006). Este microorganismo presenta una distribución ubicua, ha sido detectado en la mayor parte de los países donde se han realizado programas de muestreo y aislado en diversos ambientes (suelo, grano almacenado, cadáveres de insectos y filoplano). Entre los diferentes nichos ecológicos posibles, *B. thuringiensis* puede ser considerado un patógeno oportunista que para crear un medio apropiado de crecimiento, propicia la muerte de su insecto hospedador por medio de la actuación de múltiples toxinas, entre las que se encuentran las proteínas propias del cristal tóxico y gran variedad de factores de virulencia adicionales (Schnepf *et al.*, 1998). Hasta el año 2008, se habían descrito 84 serovares de *B. thuringiensis* diferentes, que quedan clasificados de acuerdo a su antígeno H o antígeno flagelar (Sauka y Benintende, 2008). Cada cepa puede contener uno o varios plásmidos diferentes y en cada plásmido puede encontrarse uno o varios genes *cry* (Whiteley y Schnepf, 1986).

La clasificación de las proteínas tóxicas producidas por *B. thuringiensis* está basada en el grado de identidad de su secuencia de aminoácidos con holotipos de referencia (Crickmore *et al.*, 2012). Para ello, se emplean árboles filogenéticos que estiman el grado de divergencia evolutiva entre las diferentes proteínas tóxicas producidas por *B. thuringiensis*. De esta forma, cada proteína descrita se caracteriza por una secuencia de cuatro números arábigos y letras, organizados en rangos (Ej. Cry9Aa1). El primer rango relaciona proteínas que conservan hasta un 45% de identidad y normalmente son activas frente al mismo orden de insectos. El segundo y tercer rango, comparten como máximo el 78 y 95% de su secuencia de aminoácidos, y pueden mostrar diferencias de actividad y potencia frente a las diferentes especies del mismo orden. Las proteínas que se diferencian en el cuarto rango, normalmente surgen de mutaciones puntuales (Crickmore *et al.*, 1998).

Dado el interés que genera *B. thuringiensis* como agente bioinsecticida, la producción científica en este campo es extensa. Hasta el año 2009, se habían realizado unos 1700 ensayos, evaluando 125 holotipos de toxinas de Bt frente a 163 especies de insectos diferentes (van Frankenhuyzen, 2009). En particular, se ha evaluado la actividad tóxica de proteínas Cry y Cyt principalmente frente a lepidópteros, coleópteros y dípteros. De la misma forma, se ha ido ampliado el rango de toxicidad de estas proteínas a organismos de gran variedad de reinos, filos, subclases y órdenes como protozoos, nematodos, ácaros, hemípteros, himenópteros y ortópteros (Schnepf *et al.*, 1998; van Frankenhuyzen, 2009). Actualmente, se conoce actividad insecticida de una proteína frente varios órdenes de insectos al mismo tiempo en 15 de las 87 familias descritas. Incluso, no puede ser descartado un porcentaje mayor, ya que los estudios sobre toxicidad abarcando diferentes órdenes al mismo tiempo no son abundantes (van Frankenhuyzen, 2009).

Las proteínas Cry poseen tres dominios estructurales reconocidos (Figura 1). El primero (Dominio I) está implicado en la formación del poro en el tubo digestivo del insecto y se compone de siete  $\alpha$ -hélices antiparalelas, que quedan tridimensionalmente situadas alrededor de la hélice 5. El segundo (Dominio II), también llamado prisma- $\beta$ , consiste en tres láminas  $\beta$  antiparalelas. El tercer dominio (Dominio III) consiste en dos láminas  $\beta$  antiparalelas que forman un sándwich beta con la topología de un "jelly roll" (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001). Los dominios II y III son principalmente responsables del reconocimiento y unión al receptor de la membrana de las células del epitelio digestivo (de Maagd *et al.*, 2001). Las toxinas Cry pueden llegar a tener 8 regiones conservadas en la secuencia de

aminoácidos. Entre estas secuencias, la existencia de las regiones 1-5 está relacionada con la estructura terciaria que la toxina debe mantener para conservar su actividad (Schnepf *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry. (a) Muestra la longitud relativa de las protoxinas Cry y la posición de las cinco regiones conservadas. En particular, quedan resaltadas en color las proteínas Cry9 y Cry1 para facilitar la localización de las toxinas objeto de este trabajo. (b) Estructura tridimensional de la Cry1Aa toxina activada dónde se muestran los tres dominios característicos (I: azul, II: verde y III: amarillo-rojo). Adaptado de de Maagd *et al.*, (2001).

El modo de acción de las toxinas Cry es un aspecto al que se le dedica un gran esfuerzo en investigación y, sin embargo, aún quedan muchos aspectos por dilucidar (Vachon *et al.*, 2012). A grandes rasgos, la secuencia de eventos que se explica a continuación está ampliamente aceptada. En un primer lugar, un hipotético insecto susceptible ingiere los cristales protéicos en forma de protoxinas. Una vez los cristales alcanzan el tubo digestivo, son solubilizados y cada proteína es convertida por digestión proteolítica en una toxina activa de menor tamaño al inicial. A continuación, la toxina activa se une a un receptor específico en la membrana de las células epiteliales del tubo digestivo. Como consecuencia de este reconocimiento, se produce un poro poco selectivo y permeable a pequeñas moléculas (iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares). La presencia de estos poros interfiere con la fisiología celular ya que se eliminan los gradientes iónicos transmembrana, y se produce un flujo masivo de solutos a la célula desde el lumen del tubo digestivo del insecto.

Finalmente, se produce la lisis osmótica de la célula, dañando de manera fatal el tejido epitelial del tubo digestivo y causando la muerte del insecto por intoxicación (Bravo *et al.*, 2004; Vachon *et al.*, 2012). El proceso de reconocimiento del receptor específico por la toxina y la formación del poro no está completamente elucidado. Una de las teorías más convincentes supone un modelo de unión secuencial de la toxina a varios receptores específicos. En este modelo, la protoxina se une al receptor de cadherina en la fase denominada de “pre-poro”, lo que produce un cambio conformacional en la proteína exponiendo a digestión proteolítica la región del extremo amino terminal de la secuencia. En una segunda fase, las toxinas activadas forman oligómeros tetrámeros con gran afinidad por un segundo receptor todavía no determinado (aminopeptidasa N o fosfatasa alcalina). En esta teoría, esta unión produce el poro en el tejido epitelial que desencadenará la lisis osmótica (Bravo *et al.*, 2004).

Según la clasificación actual basada en la comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína, existen 15 genes en la familia *cry9* pertenecientes a 5 clases (*cry9A*, *cry9B*, *cry9C*, *cry9D* y *cry9E*). Las proteínas para las que codifican estos genes comparten al menos el 78% de sus aminoácidos (Crickmore *et al.*, 1998). El primer gen de este grupo fue descubierto en el año 1991 y pertenece a la subclase *cry9Aa* (Smulevitch *et al.*, 1991). Hasta la fecha, se ha descrito su actividad tóxica frente a 28 larvas de insectos diferentes pertenecientes a los órdenes Lepidoptera y Coleoptera. Sin embargo, los estudios basados en familia de genes *cry9* siguen constituyendo un pequeño porcentaje de todos los trabajos realizados sobre proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* (van Frankenhuyzen, 2009). Por el contrario, los genes *cry9* presentan un gran interés. Hace más de una década, Lambert *et al.*, (1996) denominaron a la toxina Cry9Ca1 como la proteína del cristal protéico de *B. thuringiensis* más atractiva para desarrollar nuevos bioinsecticidas para el control de lepidópteros. Según estos autores, esta proteína es tóxica para las mismas especies contra las que se emplea con regularidad las toxinas Cry1Ab5 y Cry1Ac1, y amplía el rango de actividad a otras especies plaga como *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* y *Agrotis* spp. Además, las toxinas Cry9 presentan un uso prometedor ya que combinan una elevada toxicidad para algunas especies de lepidópteros (van Frankenhuyzen *et al.*, 1997) con la unión a un receptor epitelial que parece ser diferente del receptor de las toxinas Cry1, las más empleadas en el control de lepidópteros (Lambert, *et al.*, 1996, Ruiz de Escudero *et al.*, 2007). La búsqueda de toxinas que empleen receptores alternativos a las de las proteínas habitualmente utilizadas supone una pieza clave en el manejo de resistencias. De hecho, ya se han descrito poblaciones de insectos resistentes a toxinas Cry en al menos ocho cultivos al aire libre, incluyendo seis

especies de insectos resistentes a cultivos transformados con toxinas Cry de *B. thuringiensis* (Tabashnik *et al.*, 2011). De esta forma, la búsqueda de nuevos genes insecticidas, así como la caracterización de su actividad tóxica supone un ámbito de investigación de gran interés para el futuro desarrollo de alternativas en el control de plagas mediante *B. thuringiensis* (Bravo *et al.*, 1998; van Frankenhuyzen, 2009).

El empleo de *B. thuringiensis* en agricultura se ha llevado a cabo a dos niveles: (i) mediante el uso de formulados bioinsecticidas, (ii) desarrollando plantas transgénicas que expresan toxinas de propias de Bt. Los formulados bioinsecticidas actualmente disponibles pueden ser de primera, segunda y tercera generación, según el grado de modificación genética del organismo empleado. Los formulados de primera generación están compuestos por toxinas y esporas, siendo la mayoría de los productos comerciales. Su empleo es considerado un método racional e integrado de lucha contra estas plagas respetuoso con el medio ambiente. Posteriormente, se desarrollaron los bioinsecticidas de segunda generación, compuestos por aquellos formulados a partir de cepas de *B. thuringiensis* que han sido modificadas por algún mecanismo de transferencia de genes para aumentar el espectro de huéspedes frente a los que es activa o incrementar su toxicidad. En tercer lugar, los bioinsecticidas de tercera generación hacen referencia a los productos cuya formulación contiene bacterias recombinantes modificadas genéticamente con genes *cry*, o en el caso contrario, cepas de *B. thuringiensis* a las que se introducen otros factores de virulencia distintos de sus propias toxinas. Finalmente, los genes codificantes de proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* han tenido una gran aplicación en el desarrollo por ingeniería genética de plantas transgénicas. La primera introducción exitosa de un gen *cry* en plantas de tabaco y su posterior expresión de la proteína en cantidad suficiente para controlar larvas de *Manduca sexta*, data del año 1987. Desde entonces, se han introducido al menos diez tipos de genes *cry* distintos y un gen *vip* en hasta 26 especies vegetales diferentes (Sauka y Benintende, 2008). El cultivo de plantas transgénicas Bt se está ampliando de manera vertiginosa en todo el mundo. En 2010 se alcanzaron los 26 millones de ha de cultivo Bt, siendo los principales países productores Estados Unidos, Argentina y Brasil (Meissle *et al.*, 2011). Entre las razones de este gran incremento están el hecho de que estas plantas controlan satisfactoriamente a los insecto plaga diana de cada toxina y reducen la necesidad del empleo de insecticidas de síntesis química (Sauka y Benintende, 2008). Entre las posibles limitaciones que entraña el cultivo de plantas trasgénicas Bt, además del desarrollo de insectos resistentes a las toxinas Cry anteriormente descrito, se encuentra la emergencia de plagas secundarias que en un manejo tradicional del

cultivo son fácilmente controladas por insecticidas de síntesis química (Meissle *et al.*, 2011).

Los insectos pertenecientes al orden Hemiptera son un claro ejemplo de este tipo de plagas que emergen al reducir el uso masivo de insecticidas de síntesis. De hecho, según estudios en plantas Bt, se observó una mayor tasa reproductora del áfido *Rhopalosiphum maidis*, una especie no susceptible a las toxinas Cry expresadas en la planta (Faria *et al.*, 2007). Esta es una de las razones que hacen valiosa y útil la búsqueda de genes producidos por Bt con actividad tóxica frente a hemípteros (Chougule y Bonning, 2012). Hasta la fecha, hay pocas referencias de estudios que muestran una actividad insecticida frente a este orden de insectos (Walters y English, 1995; Porcar *et al.*, 2009; Sattar y Maiti, 2011). Estos trabajos hacen referencia a los genes *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry11*, *vip1-vip2*, en los que se ve cómo la dosis tóxica para hemípteros es varios órdenes superior que la dosis habitualmente empleada para combatir lepidópteros (Chougule y Bonning, 2012). Sin embargo, existen dos casos de toxinas con propiedades muy prometedoras para el control de hemípteros. Por un lado, las toxinas Vip1Ae-Vip2Ae muestran una CL<sub>50</sub> de 0,57 µg/ml frente a la especie *Aphis gossypii* (Sattar y Maiti, 2011). Mientras que por otro, la toxina bajo patente TIC807 (también denominada Cry51Aa2) que se ha expresado en plantas transgénicas de algodón ha mostrado actividad insecticida contra el género *Lygus* spp. con una CL<sub>50</sub> de aproximadamente 250 ppm (Baum *et al.*, 2012). En este contexto, la búsqueda de genes, ya sean *cry* o *vip*, que expresen proteínas con actividad insecticida frente a hemípteros sigue siendo una necesidad.

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fin de Máster fue buscar cepas de *B. thuringiensis* que contuvieran genes *cry9* y presentaran un elevado potencial insecticida frente a diferentes especies de los órdenes Hemiptera y Lepidoptera.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Búsqueda y selección de cepas portadoras de genes *cry9* mediante PCR

Como punto de partida de este trabajo se seleccionaron varias cepas de *B. thuringiensis* de la colección del Grupo de Investigación de Bioinsecticidas Microbianos con el objetivo de detectar mediante PCR la presencia de distintos tipos de genes *cry9*. Las cepas se escogieron de manera que fueran representativas de diferentes áreas geográficas y biotopos (Tabla 1).

**Tabla1.** Características de los aislados seleccionados para realizar la búsqueda de genes *cry9*.

| Aislado  | Procedencia | Biotopo                         |
|----------|-------------|---------------------------------|
| B4 1.1   | Barcelona   | Suelo cerealista. Cereal 25 cm  |
| G4.1     | Gomera      | Suelo agrícola                  |
| H29-3    | El Hierro   | Suelo agrícola                  |
| HU04-2   | Huesca      | Polvo de maíz. Silo             |
| LEAPI01  | Badajoz     | Larva muerta                    |
| ML090    | Badajoz     | Larva muerta                    |
| NA118    | Navarra     | Patata. Suelo agrícola          |
| NA142-12 | Navarra     | Polvo de granero. Silo          |
| NA142-27 | Navarra     | Polvo de granero. Silo          |
| NA142-34 | Navarra     | Polvo de granero. Silo          |
| NA142-52 | Navarra     | Polvo de granero. Silo          |
| TE25-2   | Teruel      | Polvo de cereal, trigo y cebada |
| TF26     | Tenerife    | Suelo                           |

Para detectar la presencia de genes *cry9* en las cepas seleccionadas se emplearon cebadores específicos de los genes *cry9A*, *cry9B*, *cry9C* y *cry9D*. Estos cebadores fueron diseñados para el estudio de la diversidad de genes *cry* en cepas de *B. thuringiensis* (Ben Dov *et al.* 1997). La secuencia de nucleótidos de los cebadores, así como el tamaño del amplicón esperado en la reacción, se muestra en la tabla 2.

**Tabla2.** Cebadores empleados en la búsqueda de genes *cry9* (Ben-Dov *et al.*, 1997).

| Gen          | Cebador directo (5'—3')   | Cebador reverso (5'—3')  | Tamaño esperado (pb) |
|--------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|
| <i>cry9A</i> | GGTTCACCTTACATTGCCGGTTAGC | GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC | 1547                 |
| <i>cry9B</i> | GCAAATGCATTTAGCGCTGGTCAA  | GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC | 701                  |
| <i>cry9C</i> | CCACCAGATGAAAGTACCGGAAG   | GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC | 1232                 |
| <i>cry9D</i> | GCAATAAGGGTGTCCGGTCACTGG  | GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC | 938                  |

La extracción del ADN bacteriano se realizó diluyendo en 100 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril una colonia procedente de una placa con medio LB-Agar (10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, 15 g Agar, en un volumen final de 1 L de H<sub>2</sub>O milliQ; pH 7) incubada toda la noche a 28 °C. A continuación, la suspensión se calentó a 100 °C durante 5 minutos y se mantuvo en el congelador a -20 °C durante, al menos, 20 minutos. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, compuesto por 5 µl de solución de ADN, 1 U de Taq ADN polimerasa (Bioline, UK), 2,5 µl del buffer de la enzima, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada uno de los cuatro nucleótidos trifosfato (dNTPs) y 0,5 µl de los cebadores necesarios (directo y reverso), a una concentración final de 2 µM (Tabla 2). Las condiciones de la reacción fueron: 95 °C durante 3 minutos; 30 ciclos de amplificación consistentes en 1' de desnaturalización a 95 °C, y 1' de anillamiento a una temperatura a 56 °C, y 90'' de elongación a 72 °C. Finalmente, se realizó un periodo de extensión a 72 °C durante 7 minutos.

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa (1%) en TAE (tampón tris-acetato-EDTA) para ser, posteriormente, teñidos con Bromuro de Etidio. Los geles se visualizaron mediante captura fotográfica en un transiluminador de luz UV (G:BOX, Syngene). Para la amplificación total de cada gen *cry9* se seleccionaron las cepas procurando que cada una de ellas tuviera la menor diversidad de genes *cry9* posible. Además, gracias a la caracterización de genes *cry* mediante secuenciación masiva de la cepa Hu4-02 que previamente se había llevado a cabo en el laboratorio, se introdujo esta cepa para la amplificación del gen *cry9E*.

## 4.2. Clonaje de genes *cry9*

### 4.2.1. Amplificación completa de los genes *cry9*

La amplificación completa de los genes *cry* se realizó mediante de cebadores específicos de la región nucleotídica correspondiente al extremo amino-terminal, comenzando en el primer ATG y carboxilo-terminal (justo antes del codón de parada), de los diferentes genes (Tabla 3). Con el objetivo de amplificar los genes *cry* con una baja tasa de mutaciones se empleó una enzima de alta fidelidad (PrimeSTAR®HS DNA polymerase, Takara Bio Inc, Japan). La mezcla de la reacción se realizó en un volumen final de 25 µl y consistió en 5 µl de 5x PrimeSTAR Buffer (Mg<sup>2+</sup>plus), 2 µl de la mezcla de dNTPs, 0,25 µl de PrimeSTAR®HS ADN polimerasa, los cebadores específicos a una concentración final de 0,3 µM y 5 µl de ADN molde. Las condiciones empleadas en la reacción de PCR de alta fidelidad fueron: 95 °C durante 3 minutos; 32 ciclos de amplificación consistentes en 30" de desnaturalización a 95 °C, y 30" de anillamiento a 52-56 °C, 3' 40" de elongación a 72 °C; y un periodo de extensión a 72 °C durante 12 minutos.

La extracción del ADN bacteriano se realizó como se ha descrito anteriormente, excepto para las cepas TF26 y NA142-12, cuyos plásmidos fueron purificados por columna mediante el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Germany), a partir de un cultivo de 5 ml en medio LB a 28 °C y 200 rpm, crecido durante 16 horas aproximadamente.

### 4.2.2. Diseño de cebadores y análisis de secuencias

Los cebadores específicos para amplificar los genes *cry9* se diseñaron a partir de la base de datos de genes insecticidas de *B. thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 2012), empleando el programa informático Serial Cloner v. 2.1 (Tabla 3).

### 4.2.3. Clonaje de los productos de PCR

El clonaje de los genes *cry9* una vez amplificados se realizó en el vector pJET (CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas, Canada) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El clonaje se produjo a partir del gen completo amplificado y purificado del gel de agarosa (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Germany).

**Tabla 3.** Cebadores específicos diseñados para amplificar y clonar genes *cry9*.

| Gen          | Gen referencia para secuencia (Acc. N°) | Tipo cebador | Cebador                                     |                      |
|--------------|---|--------------|---|----------------------|
|              |   |              | Secuencia <sup>(1)</sup>                    | Tª anillamiento (°C) |
| <i>cry9A</i> | Cry09Aa1 (CAA41122)                     | Directo      | <u>GTCGAC</u> ATGAATCAAAATAAACACGGAATTA     | 55                   |
|              |   | Reverso      | <u>CTCGAG</u> CTTTTCTGTTTCAACGAATTCAATAC    |                      |
| <i>cry9B</i> | Cry09Bb1 (AAV28716)                     | Directo      | <u>GGATCC</u> CATGAATCGAAATAATCAAAATGAATATG | 52                   |
|              |   | Reverso      | <u>GTCGAC</u> CTCTTGTGTTTCAATGAGCTC         |                      |
| <i>cry9C</i> | Cry09Ca1 (CAA85764)                     | Directo      | <u>GGATCC</u> CATGAATCGAAATAATCAAAATGAATATG | 56                   |
|              |   | Reverso      | <u>GTCGAC</u> CTCTTGTGTTTCAATAAACTCAAT      |                      |
| <i>cry9D</i> | Cry09Da1 (BAA19948)                     | Directo      | <u>GGATCC</u> CATGAATCGAAATAATCAAAATGAATATG | 56                   |
|              |   | Reverso      | <u>GTCGAC</u> CTCTTGTGTTTCAATAAACTCAAT      |                      |
| <i>cry9E</i> | Cry9E (Secuencia en HU4-2)              | Directo      | <u>GCTAGC</u> ATGAATCGAAATAATCAAAATGAATATG  | 55                   |
|              |   | Reverso      | <u>GAATTC</u> CTCTTGTGTTTCAATGAACTCA        |                      |

<sup>1)</sup> La secuencia de los cebadores incluye sitios para dianas de restricción y una región de solapamiento con los genes *cry9* de 21-28 nt.

La reacción de ligación se llevó a cabo empleando como mezcla de reacción 5 µl del 2x Reaction Buffer, 1 µl de T4 DNA Ligase, ADN purificado, pJET1.2/blunt Cloning Vector, completando hasta un volumen final de 20 µl con H<sub>2</sub>O MiliQ estéril. La relación entre ADN del inserto y ADN del vector se calculó en base a la fórmula del pGEM-T para optimizar la ligación, siendo 3:1 la relación molar inserto:vector:

$$\text{ng of insert} = \frac{\text{ng of vector} \times \text{Kb size of insert}}{\text{Kb size of vector}} \times \frac{3}{1}$$

La concentración de ADN disponible se calculó por comparación con los valores proporcionados por el marcador de peso molecular Hyperladder I, en un gel de agarosa (0,8%). La reacción de ligación se realizó a temperatura ambiente durante 30

minutos. El producto de la ligación se sometió a una diálisis para eliminar las sales de la mezcla, colocando 10 µl del producto sobre filtros Millipore VSWP de 0,025 µm, durante 30 minutos. A continuación, se realizó la transformación por electroporación de células de *Escherichia coli* DH10β, que fueron suministradas en un kit comercial (MegaX DH10B™ T1<sup>R</sup> Electrocomp™ Cells, Invitrogen, Life Technologies Ltd., UK). Para ello, se añadieron 10 µl del producto de la ligación a 40 µl de células competentes. La mezcla se introdujo en cubetas de electroporación de 0,1 cm (Gene Pulser® Cuvette, Biorad, USA), donde fue sometida a un pulso eléctrico (2,0 kV, 200 Ω y 25 µF). Posteriormente, las células se incubaron durante una hora en 1 ml de medio de recuperación (Recovery Medium; Invitrogen, Life Technologies Ltd., UK) en condiciones de agitación (200 rpm) y a 37 °C. Las células transformadas se sembraron en placas de LB Amp (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Para confirmar que las colonias seleccionadas tras la transformación hubieran incorporado el gen *cry9*, se realizó la extracción del plásmido con el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Germany), seguido de una doble digestión con las enzimas incorporadas en los cebadores, que debería liberar un fragmento del tamaño del gen *cry9* (Tabla 3). Los fragmentos se visualizaron en un gel de agarosa al 0,8%.

#### 4.2.4. Clonaje de los genes *cry9* en el vector *pET28b*

Cada gen *cry9* fue subclonado en el vector de expresión *pET28b* para la producción y purificación de la correspondiente proteína. Para ello, se realizó una doble digestión, tanto del plásmido *pET28b*, como del plásmido *pJet1.2/blunt* que tenía incorporado el gen *cry9* de interés. La doble digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción que reconocen las dianas que se incorporaron en los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen (Tabla 3). Los fragmentos digeridos se visualizaron en un gel de agarosa al 0,8% y las bandas correspondientes al tamaño del gen *cry9* y el plásmido *pET28b* fueron purificadas con el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Germany). El ADN fue cuantificado en un gel de agarosa al 0,8%. La ligación se llevó a cabo durante toda la noche a 16 °C, en un volumen final de 20 µl, empleando 1 µl de enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs Inc., UK), 2 µl de 10x T4 DNA Ligase Buffer y volúmenes de ADN en proporción molar 1:3 (vector *pET28b*:inserto). Posteriormente se transformaron células de *E. coli* DH10β con el producto de la ligación, siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior, con la salvedad de que el antibiótico selectivo empleado fue Kanamicina (50 µg/ml). Se seleccionaron 4-6 colonias de las placas resultantes de la transformación y se comprobó la presencia del gen en el plásmido *pET28b* extrayendo y digiriendo el

plásmido con las enzimas de restricción correspondientes. Los genes fueron secuenciados analíticamente (Sistemas Genómicos, Valencia, Spain) para confirmar que el gen de interés se clonó adecuadamente antes de ser inducida su expresión.

Finalmente, se realizó una segunda transformación del plásmido pET-28b que incorporó el gen *cry9*, en la cepa *E. coli* One Shot® BL21(DE3) (Invitrogen). Las células fueron transformadas con el siguiente protocolo: Se añadió 10 µl del plásmido pET-28b que había incorporado el gen *cry9* a 40 µl de células competentes. Se mantuvo la mezcla en hielo durante 30 minutos y se aplicó un choque térmico de 42 °C durante 2 minutos. A continuación se añadieron 500 µl de LB y se mantuvo a 37 °C en agitación durante 1 hora. Finalmente, se sembraron las células en placas de LB/Kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se seleccionaron 4 colonias transformadas para comprobar mediante digestión que hubieran incorporado el plásmido y el gen *cry9*.

#### 4.3. Producción de las proteínas Cry9



Para comenzar el proceso de producción de la proteína, se seleccionó una colonia de BL21(DE3) transformada con el vector pET28b que incorporara el gen *cry9* de interés. El preinóculo se obtuvo a partir de un cultivo de 125 ml de medio 2xTY (16 g triptona, 10 g extracto de levadura, 5 g NaCl, en un volumen final de 1 l de H<sub>2</sub>O milliQ; pH. 7) incubado toda la noche a 37 °C y 200 rpm en un matraz de 500 ml, que fue inoculado con la colonia seleccionada. A continuación, se inocularon dos matraces de 2 l, que contenían 500 ml de 2xTY cada uno con 10 ml de precultivo y se mantuvo a 37 °C y 200 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,6 ( $\lambda=600$  nm). En ese momento se indujo la expresión de la proteína con IPTG (2 mM). Tras un periodo de 6 horas de cultivo, se recuperaron las células centrifugando a 5.500 rpm durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante para congelar el pellet a -20 °C. Al día siguiente se inició el proceso de extracción, solubilización y purificación de la proteína. Para ello se resuspendió cada pellet obtenido en 10 ml de buffer (20 mM buffer fosfato pH 7,4; 500 mM NaCl; 3 mg/ml lysozima). Se añadió 20 µl de Benzonasa (25 U/µl) y 20 µl de PMSF (100mM) a cada tubo de centrifuga y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se lisaron las células mediante sonicación con ultrasonidos (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, USA.) con 3 ciclos de 60 segundos a 50-60% de potencia y manteniendo periodos de descanso de 60 segundos entre los ciclos. Tras centrifugar las células a 10.000 rpm durante 30 minutos se recuperó el pellet que fue resuspendido en un volumen de buffer alcalino (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,1 M NaCl; 10mM DTT) y se incubó en agitación magnética durante 2 horas en hielo para

solubilizar los cuerpos de inclusión. Posteriormente, se centrifugó durante 45 minutos a 10.000 rpm y se conservó el sobrenadante que contenía la toxina soluble. Se ajustó el pH de esta solución a 8,4 con HCl diluído y se filtró el sobrenadante con filtros de acetato de celulosa de tamaño 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,2  $\mu\text{m}$ . A continuación, se purificó la proteína mediante columnas de afinidad Niquel-Histidina (Protino Ni-TED 1000 Machery-Nagel, UK), y tras la elución de la proteína se realizó un cambio de buffer a tampón carbonato (50mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 100 mM NaCl, pH 11,3); con columnas de desalado (SephadexTH G-25M, GE Healthcare). Durante el proceso de expresión y purificación, se tomaron muestras que fueron observadas en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 11% para identificar las bandas obtenidas en el perfil protéico. Se empleó el marcador molecular Precision Plus Protein™ Standars – Dual color (BioRad, USA). La proteína se cuantificó según el método Bradford (Bradford, 1976).

#### 4.4. Evaluación de la toxicidad de las proteínas Cry9

Para determinar el espectro insecticida de las proteínas Cry9 producidas se emplearon diferentes métodos de bioensayos dependiendo de las características de los insectos.

##### 4.4.1. Bioensayos con lepidópteros

En el caso de las especies de lepidópteros las toxinas fueron suministradas a los insectos siguiendo el método de contaminación superficial de la dieta. Para ello, se empleó una dieta general de lepidópteros (Greene *et al.*, 1976) que fue distribuida en cajitas con 24 pocillos mientras permanecía líquida. Una vez solidificada la dieta, se impregnó superficialmente con 30  $\mu\text{l}$  de una determinada dilución de la proteína. Tras la evaporación del agua, se colocó una larva neonata en cada pocillo y se cerró la placa colocando tres capas de papel absorbente para evitar el exceso de humedad y sellar completamente la placa. El bioensayo se mantuvo en condiciones controladas 16:8 horas (luz:oscuridad), 25 °C y 70% de Humedad relativa.

Para seleccionar aquellas especies susceptibles a la toxina producida cada una de ellas fue ensayada a una (1000  $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) o dos dosis (1000 y 500  $\text{ng}/\text{cm}^2$ ). Como control se utilizó una placa de 24 pocillos dónde se dispensó buffer carbonato sobre la dieta. Este ensayo se realizó con todas las especies disponibles en el laboratorio de Bioinsecticidas Microbianos (*Chrysodeixis chalcites*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis*, *Helicoverpa armigera*, *Mamestra brassicae* y *Ostrinia nubilalis*). Cada bioensayo se repitió al menos dos veces para las proteínas que mostraron actividad. La mortalidad fue evaluada a los 5 días.

#### 4.4.2. Bioensayos con áfidos

Los áfidos empleados en este trabajo provienen de una colonia de *Myzus persicae* (Sulzer) generada a partir de una hembra recolectada en un cultivo de pimiento localizado en El Encín (Madrid), en 1989. La colonia fue amablemente cedida por el Prof. Alberto Ferrer (grupo de Insectos Vectores de Patógenos de Plantas, Instituto de Ciencias Agrarias, CSIC). La colonia de pulgones se mantuvo alimentándose sobre planta de pimiento (*Capsicum annuum* L.), en una cámara climática con condiciones controladas de fotoperiodo (16:8), temperatura (25 °C) y humedad (70%).

La metodología empleada para evaluar el potencial insecticida de las toxinas de *B. thuringiensis* sobre *M. persicae* es una adaptación de la descrita por Sadeghi *et al.* (2009). Se diseñó como unidad experimental una cajita cilíndrica de 3 cm de diámetro y 1,5 cm de altura, donde se introdujeron de 10 a 15 pulgones en estadio ninfal N1-N2. Las cohortes de insectos de igual edad fueron obtenidas confinando previamente adultos en hojitas de pimiento embebidas en un vial de 1,5 ml con H<sub>2</sub>O. Las cajitas donde se colocaron las ninfas de *M. persicae* fueron selladas en su abertura superior con una capa de Parafilm®M (Brand, Germany). Sobre esta capa se situaron 100 µl de solución alimenticia de sacarosa al 20% (con toxina o sin ella) y se confinó situando otra capa de parafilm sobre ella, evitando la presencia de aire entre ambas capas. Los insectos se alimentaron de esta solución atravesando con sus estiletes la fina capa de parafilm. El bioensayo se mantuvo en condiciones controladas (25 °C, 16L:8O, 70%HR) durante tres días, momento en que se evaluó la mortalidad en los insectos.

Siguiendo esta metodología, junto con las proteínas Cry9 producidas en este trabajo, se ensayaron una batería de proteínas Vip3 descubiertas y producidas anteriormente en el laboratorio de Bioinsecticidas Microbianos. Se empleó como control una solución de sacarosa al 20%, en H<sub>2</sub>O milliQ o buffer carbonato, en función del buffer empleado para solubilizar la toxina.

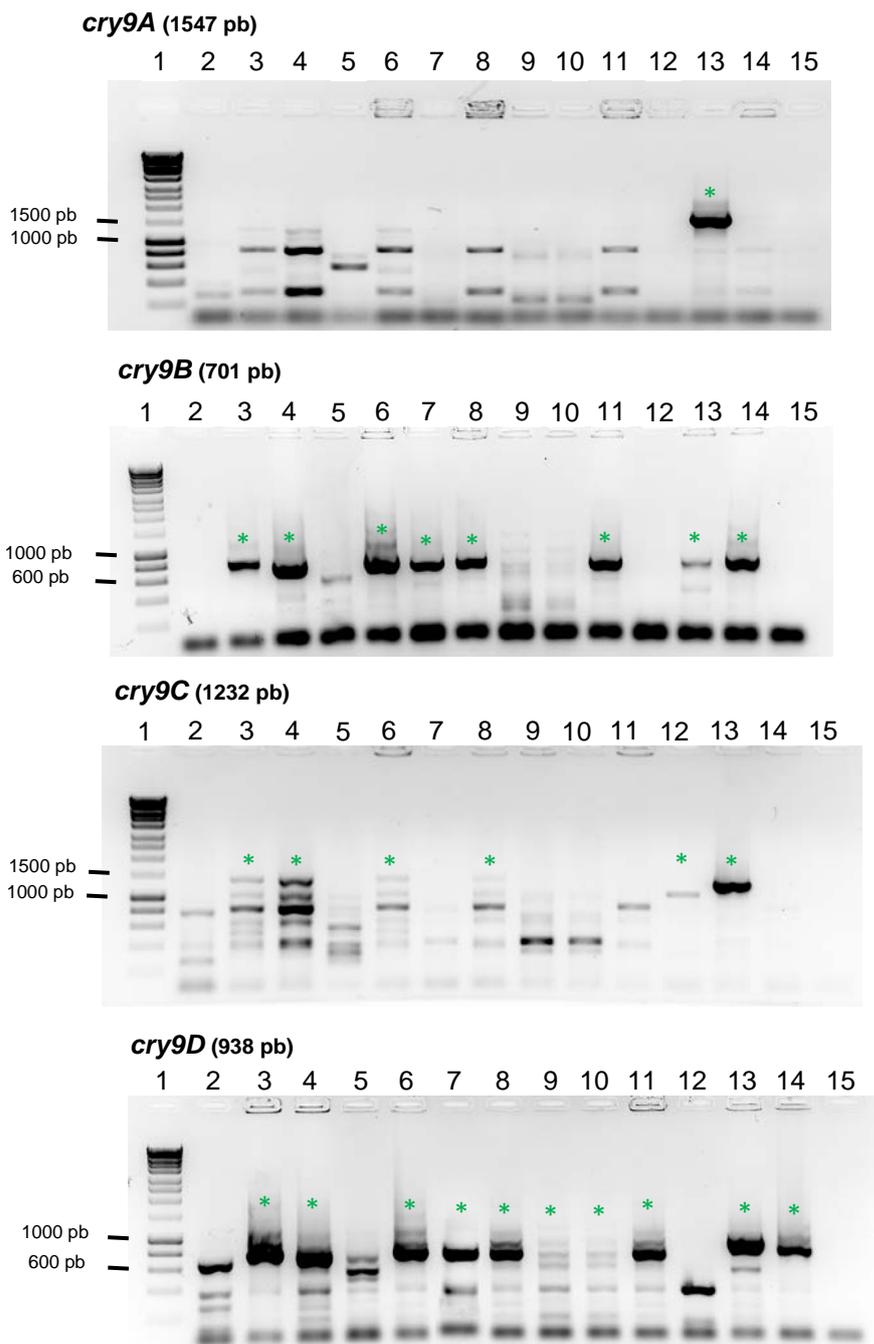
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Selección de cepas portadoras de genes *cry9*

La amplificación de genes *cry9* en base a los cebadores específicos utilizados se muestran en la figura 2. Se detectaron cepas que presentan varios genes *cry9*, así como dos cepas que no portaban ningún gen de esta clase (Tabla 4). En conjunto, se detectaron genes *cry9* en un elevado porcentaje de las cepas evaluadas, *cry9A* (8%), *cry9B* (62%), *cry9C* (46%) y *cry9D* (77%).

Es interesante resaltar que se encontró al menos un gen codificante para una proteína Cry9 en la mayoría de las cepas evaluadas. Este resultado es una muestra más de la riqueza y diversidad de genes tóxicos insecticidas que presenta *B. thuringiensis*, así como un impulso para seguir estudiando este organismo, que todavía sigue ofreciendo nuevos genes con actividad tóxica de espectro desconocido (Palma *et al.*, 2012). En particular, las muestras estudiadas provienen, en parte, de un estudio realizado por Iriarte *et al.*, (1998) donde se desarrolló un muestreo intensivo en diferentes biotopos y regiones españolas. En este trabajo identificaron 38 serovares diferentes de *B. thuringiensis*, que supuso el 65% de los descritos hasta ese momento a nivel mundial.

Otros trabajos de búsqueda y caracterización de genes *cry* también han estudiado la distribución de los genes *cry9* en base a cebadores específicos (Bravo *et al.*, 1998; Ben-Dov *et al.*, 1997). Los resultados varían en la frecuencia de genes *cry9* entre el 3% en México (Bravo *et al.*, 1998), 10% en Israel (Ben-Dov *et al.*, 1997), 14% en India (Patel *et al.*, 2009), 30% en Irán (Seifinejad *et al.*, 2008) y el 37% en Tailandia (Thammasittirong y Attathom, 2008). Además, es habitual encontrar otros genes *cry1*, *cry2* o *vip3* en cepas que contienen *cry9* (Thammasittirong y Attathom, 2008; Seifinejad *et al.*, 2008), si bien no parecen estar ligados en todos los casos (Sauka y Benintende, 2008).



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa (1%) que muestra los productos de PCR amplificados de cepas nativas de *B. thuringiensis* con los cebadores específicos de genes *cry9* (Ben-Dov *et al.*, 1997). Se indican con un asterisco (\*) aquellos carriles dónde se identifican bandas características de genes *cry9*. (1) Hyperladder I; (2) G4.1; (3) NA142-34; (4) B4.1-1; (5) LEAPI01; (6) NA142-27; (7) TE 25-2; (8) ML090; (9) NA142-52; (10) NA142-12; (11) NA118; (12) TF26; (13) H29-3; (14) HU04-2; (15) Control – (H<sub>2</sub>O).

**Tabla 4.** Presencia de genes *cry* en la colección de cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas.

| Cepa     | <i>cry9A</i> | <i>cry9B</i> | <i>cry9C</i> | <i>cry9D</i> |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| G4.1     | -            | -            | -            | -            |
| NA142-34 | -            | +            | +            | +            |
| B4.1-1   | -            | +            | +            | +            |
| LEAPI01  | -            | -            | -            | -            |
| NA142-27 | -            | +            | +            | +            |
| TE25-2   | -            | +            | -            | +            |
| ML090    | -            | +            | +            | +            |
| NA142-52 | -            | -            | -            | +            |
| NA142-12 | -            | -            | -            | +            |
| NA118    | -            | +            | -            | +            |
| TF26     | -            | -            | +            | -            |
| H29-3    | +            | +            | +            | +            |
| HU04-2   | -            | +            | -            | +            |

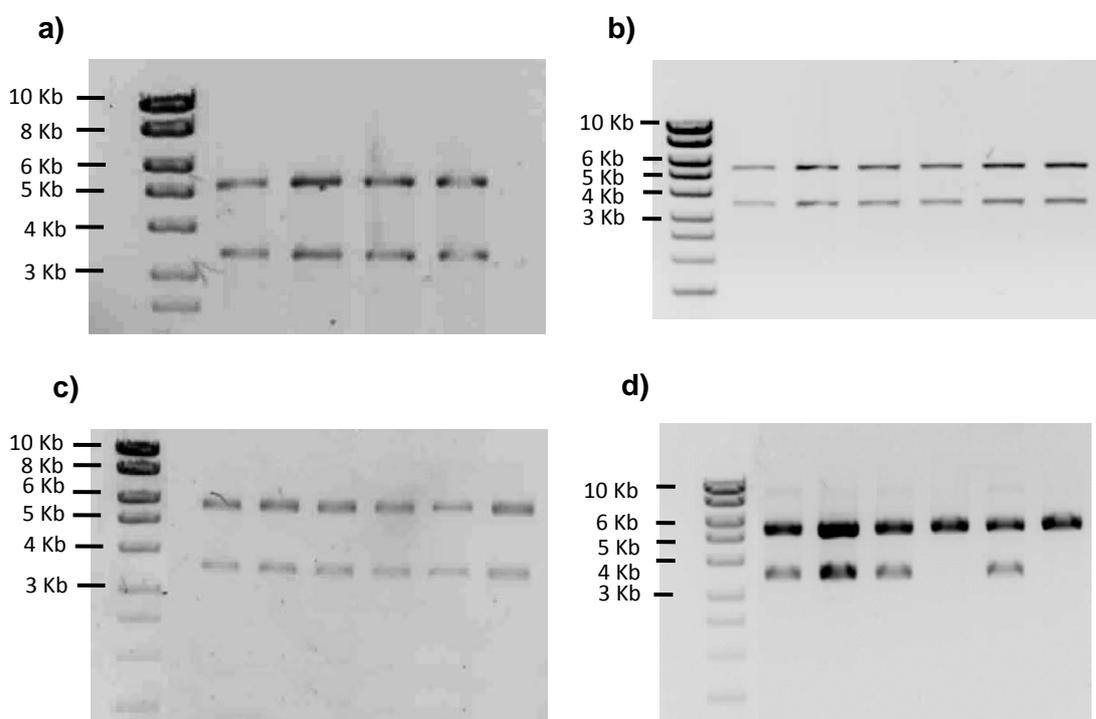
En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron 5 cepas para amplificar completamente cada uno de los genes *cry9*: *cry9A* (H29-3), *cry9B* (NA118), *cry9C* (TF26), *cry9D* (NA142-12). Además, se incluyó en el estudio la cepa HU4-2 cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado en el laboratorio de Bioinsecticidas Microbianos y ha demostrado poseer el gen *cry9E*, por comparación en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Los cebadores específicos empleados para detectar la diversidad de genes *cry9* amplifican regiones propias y únicas de cada subclase (Ben-Dov *et al.*, 1997). Sin embargo, las regiones de los extremos amino y carboxilo terminal de los diferentes genes *cry9* presentan una baja variabilidad en su secuencia. Esto condicionó que los cebadores que amplificaron el gen completo fueron bastante similares y pudo dar lugar a amplificaciones inespecíficas de un gen *cry9* diferente del gen diana del cebador diseñado. Por esta razón se trató de seleccionar cepas que contenían una baja

diversidad de genes *cry9* (ej. *cry9C*, *cry9D*), si bien en algunos casos (*cry9A*, *cry9B*, *cry9E*) no fue posible aplicar este criterio.

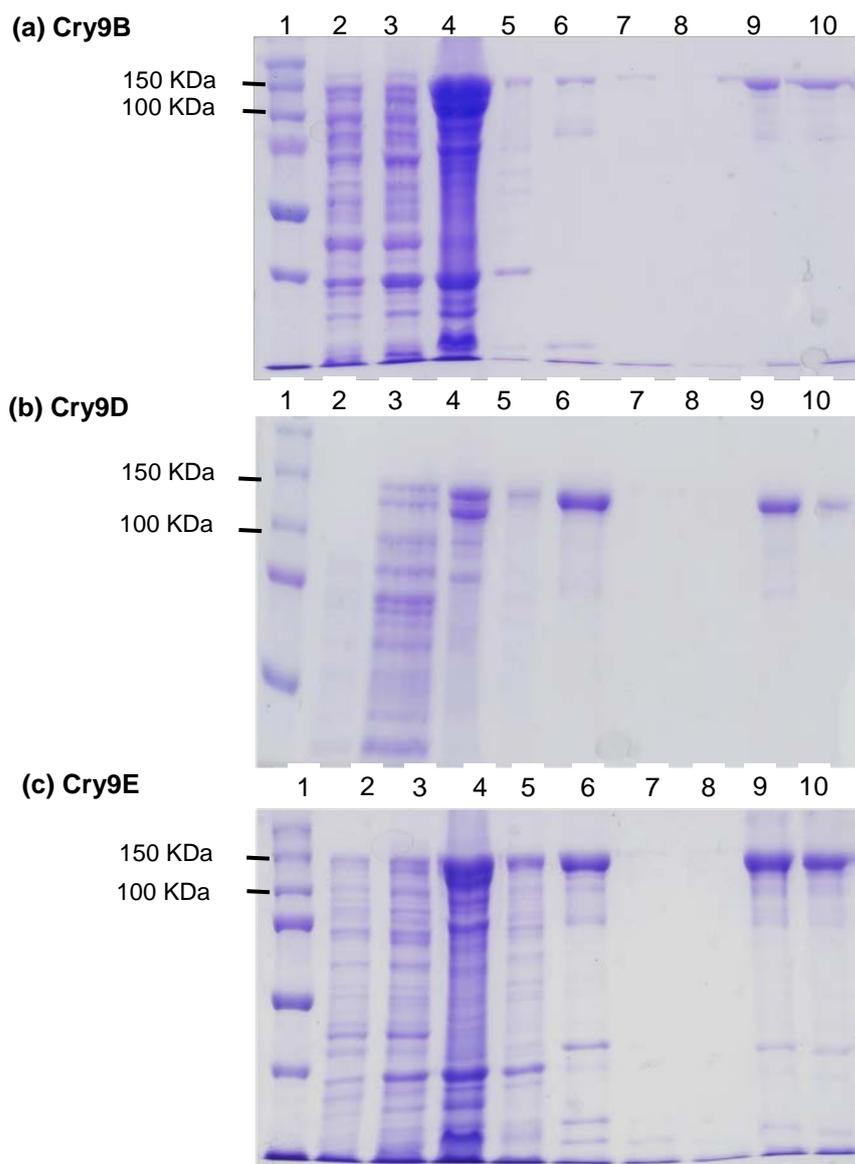
## 5.2. Amplificación completa de los genes *cry9* y producción de las proteínas Cry9

El proceso de clonaje fue satisfactorio para el caso de los genes *cry9B*, *cry9C*, *cry9D* y *cry9E* (Figura 3).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa (0,8%) que muestra los productos de la doble digestión del plásmido pET28 (5kb), que ha liberado el gen *cry9* (3,5 kb) incorporado. a) pET28b + *cry9B*, b) pET28 + *cry9C*, c) pET28 + *cry9D*, d) pET28 + *cry9E*.

El proceso de producción se llevó a cabo correctamente para las proteínas Cry9B, Cry9D y Cry9E. En los tres casos se obtuvo una proteína de un tamaño en torno a 140-150 KDa que quedó retenida en la columna de Niquel y fue eluída principalmente en la primera fracción (Figura 4). Además, la cuantificación por el método de Bradford, estimó una cantidad de proteína de 270 µg/ml (Cry9B), 354 µg/ml (Cry9D) y 474 µg/ml (Cry9E).



**Figura 4.** SDS-PAGE donde se muestra la expresión y purificación de las proteínas (a) Cry9B, (b) Cry9D y (c) Cry9E. Cada carril corresponde con una alícuota tomada en el proceso de producción y purificación. (1) Marcador: Precision Plus Protein™ Standars; (2) Muestra pre-inducción; (3) Muestra post-inducción; (4) Pellet; (5) Sobrenadante tras el proceso de solubilización; (6) Primera fracción eluída de la columna PROTINO®; (7) Segunda fracción eluída de la columna PROTINO®; (8) Tercera fracción eluída de la columna PROTINO®; (9) Primera fracción de la columna de desalado; (10) segunda fracción de la columna de desalado.

Se obtuvieron rendimientos de toxina en torno a 1 o 1,5 mg en cada litro de medio de cultivo empleado, que pueden considerarse valores bajos si se comparan con otras proteínas producidas en el laboratorio (ej. Vip3). Este bajo rendimiento podría ser debido a una solubilización incompleta de los cuerpos de inclusión ya que las cepas de *E. coli* transformadas para producir las toxinas Cry9, acumularon mayoritariamente la proteína en una fracción insoluble. Siguiendo la metodología establecida por otros autores (Lambert *et al.*, 1996; Porcar *et al.*, 2009), fue necesario incluir en el proceso de producción un paso de solubilización a pH básico en tampón carbonato. Tal y como se observa en la Figura 4, gran parte de la proteína resultante del paso de solubilización (carril 5 en el gel), se correspondió con la proteína Cry9 expresada, que fue retenida en la columna de Niquel durante la purificación gracias a la cola de Histidinas incluida en la proteína recombinante por el vector pET-28b.

### 5.3. Espectro de actividad frente a lepidópteros

El proceso de amplificación de genes *cry9* y la posterior transformación de bacterias recombinantes de *E. coli* con plásmidos que incorporaron estos genes, permitió caracterizar las propiedades insecticidas de los genes *cry9*, evitando las posibles interferencias del resto de proteínas tóxicas presentes en las cepas originales de *B. thuringiensis* portadoras del gen *cry9*. Esta metodología tiene dos claras aplicaciones. Por un lado, la caracterización de una nueva toxina puede ayudar al desarrollo de formulados de bioinsecticidas, de primera, segunda o tercera generación (Sauka y Benintende, 2008), que sean altamente tóxicos para el rango de especies en que la proteína muestre actividad insecticida. Esto puede aportar herramientas para que los agricultores empleen bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* como estrategia de control de plagas emergentes; como en el caso de *Tuta absoluta* (la polilla del tomate) y *Chrysodeixis chalcites* (Mollá *et al.*, 2011; Domínguez *et al.*, 2012). La segunda aplicación se relaciona con el desarrollo de plantas transgénicas que expresen nuevos genes tóxicos de *B. thuringiensis*. Incluso, estudios recientes prueban proteínas quiméricas (Cry9Ca+Vip3Aa7) cuya actividad resulta más elevada que la de la mezcla de las proteínas individuales lo que permite aumentar su actividad tóxica frente a *Plutella xylostella*, un insecto plaga de crucíferas que fácilmente desarrolla resistencias frente a insecticidas (Dong *et al.*, 2012).

Las tres toxinas producidas, Cry9B, Cry9D y Cry9E, mostraron un rango de actividad similar para las especies ensayadas (Tablas 5, 6 y 7).

**Tabla 5.** Mortalidad producida por la toxina **Cry9B** en larvas neonatas de lepidópteros.

| Especie                       | Control        |                                | Dosis 1000 ng/cm <sup>2</sup> |                                | Dosis 500 ng/cm <sup>2</sup> |                                |
|-------------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
|                               | n <sup>1</sup> | Mortalidad±sd <sup>2</sup> (%) | n <sup>1</sup>                | Mortalidad±sd <sup>2</sup> (%) | n <sup>1</sup>               | Mortalidad±sd <sup>2</sup> (%) |
| <i>Chrysodeixis chalcites</i> | 46             | 4,3 ± 6,1                      | 44                            | 97,8 ± 3,1                     | 40                           | 17,7 ± 4,8                     |
| <i>Mamestra brassicae</i>     | 46             | 2,2 ± 3,1                      | 45                            | 80,1 ± 1,3                     | 45                           | 13,4 ± 1,3                     |
| <i>Ostrinia nubilalis</i>     | 40             | 5,0 ± 6,1                      | 27                            | 50,0 ± 70,7                    | 29                           | 0                              |
| <i>Helicoverpa armigera</i>   | 20             | 15,0                           | 24                            | 12,5                           | -                            | -                              |
| <i>Spodoptera frugiperda</i>  | 24             | 0                              | 23                            | 4,3                            | -                            | -                              |
| <i>Spodoptera exigua</i>      | 24             | 8,3                            | 24                            | 0                              | -                            | -                              |
| <i>Spodoptera littoralis</i>  | 25             | 0                              | 23                            | 0                              | -                            | -                              |

<sup>1</sup>n= número de individuos evaluados.

<sup>2</sup>sd: desviación estándar

**Tabla 6.** Mortalidad producida por la toxina **Cry9D** en larvas neonatas de lepidópteros.

| Especie                       | Control        |                                | Dosis 1000 ng/cm <sup>2</sup> |                                | Dosis 500 ng/cm <sup>2</sup> |                                |
|-------------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
|                               | n <sup>1</sup> | Mortalidad±sd <sup>2</sup> (%) | n <sup>1</sup>                | Mortalidad±sd <sup>2</sup> (%) | n <sup>1</sup>               | Mortalidad±sd <sup>2</sup> (%) |
| <i>Chrysodeixis chalcites</i> | 46             | 0,0                            | 31                            | 90,9 ± 12,9                    | 29                           | 96,7 ± 4,7                     |
| <i>Mamestra brassicae</i>     | 47             | 10,6 ± 14,7                    | 40                            | 73,6 ± 30,0                    | 40                           | 86,2 ± 11,2                    |
| <i>Ostrinia nubilalis</i>     | 37             | 2,7 ± 3,5                      | 21                            | 100                            | 15                           | 100                            |
| <i>Helicoverpa armigera</i>   | 24             | 0                              | 24                            | 0                              | -                            | -                              |
| <i>Spodoptera exigua</i>      | 24             | 4,2                            | 24                            | 0                              | -                            | -                              |
| <i>Spodoptera littoralis</i>  | 24             | 0                              | 24                            | 0                              | -                            | -                              |

<sup>1</sup>n= número de individuos evaluados.

<sup>2</sup>sd: desviación estándar

**Tabla 7.** Mortalidad producida por la toxina **Cry9E** en larvas neonatas de lepidópteros.

| Especie                       | Control        |                                   | Dosis 1000 ng/cm <sup>2</sup> |                                   | Dosis 500 ng/cm <sup>2</sup> |                                   |
|-------------------------------|----------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|                               | n <sup>1</sup> | Mortalidad±sd <sup>2</sup><br>(%) | n <sup>1</sup>                | Mortalidad±sd <sup>2</sup><br>(%) | n <sup>1</sup>               | Mortalidad±sd <sup>2</sup><br>(%) |
| <i>Chrysodeixis chalcites</i> | 46             | 0,0                               | 35                            | 86,7 ± 9,4                        | 35                           | 100                               |
| <i>Mamestra brassicae</i>     | 47             | 10,6 ± 14,7                       | 39                            | 72,1 ± 17,1                       | 36                           | 89,4 ± 6,2                        |
| <i>Ostrinia nubilalis</i>     | 37             | 2,7 ± 3,5                         | 27                            | 100                               | 17                           | 100                               |
| <i>Helicoverpa armigera</i>   | 24             | 0,0                               | 24                            | 0                                 | -                            | -                                 |
| <i>Spodoptera exigua</i>      | 24             | 4,2                               | 24                            | 0                                 | -                            | -                                 |
| <i>Spodoptera littoralis</i>  | 24             | 0,0                               | 24                            | 0                                 | -                            | -                                 |

<sup>1</sup>n= número de individuos evaluados.

<sup>2</sup>sd: desviación estándar

En general, las proteínas Cry9B, Cry9D y Cry9E fueron altamente tóxicas a la dosis de 1000 ng/cm<sup>2</sup> para tres especies de lepidópteros: *Chrysodeixis chalcites*, *Mamestra brassicae* y *Ostrinia nubilalis*, pertenecientes a dos familias distintas, Noctuidae y Piralidae. La única excepción a esta generalización es la toxina Cry9B, que mostró una actividad intermedia frente a la especie *Ostrinia nubilalis* cuando se ensayó la dosis más elevada. Por el contrario, ninguna de las toxinas ensayadas mostró actividad insecticida contra las especies *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* y *Spodoptera littoralis*.

En relación con las tres especies de lepidópteros y toxinas descritas en este trabajo, tan sólo se han encontrado dos datos de toxicidad en la literatura disponible hasta la fecha (Silva-Werneck y Ellar, 2008; Hua *et al.*, 2001). En el trabajo de Silva-Werneck y Ellar (2008) se evaluó la toxina Cry9Bb frente a *Mamestra brassicae*, estimando una concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de 20 µg/cm<sup>2</sup>. Nuestros datos indican una concentración menor ya que la mortalidad producida por Cry9B a 1 µg/cm<sup>2</sup> ronda el 80%. Sin embargo, al contrario que en nuestros resultados, los autores observaron actividad para la proteína Cry9Bb contra *S. frugiperda*. No obstante, la concentración empleada en ese estudio para causar la muerte a menos del 30% de las larvas fue 20 veces superior que nuestra mayor concentración (Silva-Werneck y Ellar, 2008). Por otro lado, Hua *et al.* (2001), estudió la interacción de diferentes proteínas Cry con los receptores de la membrana epitelial del intestino de *O. nubilalis*. Entre las diferentes toxinas evaluadas, se determinó la CL<sub>50</sub> para la proteína Cry9E (830 ng/ml de dieta), siendo considerada muy activa frente a esta especie. Aunque los métodos de bioensayo no son comparables, ya que nuestro trabajo se realizó siguiendo la

metodología de contaminación superficial frente a la inclusión de la toxina en la dieta; sin embargo, coincidimos con los autores del trabajo en que Cry9E es una toxina altamente tóxica para *O. nubilalis*.

Dentro de la clase de proteínas Cry9, la mayor parte de ensayos de toxicidad se han realizado con las subclases Cry9A y Cry9C. Si bien los datos no son comparables debido a la especificidad del rango de huésped que caracteriza a las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*, se han obtenido datos de toxicidad muy prometedores para especies como *Lobesia botrana* (Ruiz de Escudero *et al.*, 2007), *Agrotis ipsilon* (de Maagd, 2003), *H. armigera* (Li y Bower, 2012), *Choristoneura fumiferana* (van Frankenhuyzen *et al.*, 1997) *S. exigua*, *S. littoralis*, *M. brassicae*, *Agrotis segetum*, *Heliothis virescens*, *Manduca sexta*, *O. nubilalis* y *P. xylostella* (Lambert *et al.*, 1996). Por otro lado, en este trabajo se ha evaluado la actividad tóxica de las protoxinas. Sería interesante evaluar la actividad insecticida de estas mismas proteínas, previa digestión con tripsina, ya que se ha visto en la mayoría de las combinaciones toxina-insecto cómo se incrementa su toxicidad tras este proceso de activación (62,5%) (van Frankenhuyzen, 2009).

#### 5.4. Espectro de actividad frente a áfidos

Entre las toxinas seleccionadas en el laboratorio para evaluar su toxicidad contra el pulgón *M. persicae*, tan sólo una de ellas resultó activa (Tabla 8). Esta proteína, denominada Vip3Ca3 fue descubierta en el laboratorio de Bioinsecticidas Microbianos (Palma *et al.*, 2012). Además, sólo dicha proteína mostró actividad tóxica cuando se comparó su toxicidad con el resto de las toxinas del grupo Vip3Ca (Tabla 9).

Por otro lado, el tampón carbonato (pH 11,3) empleado como buffer para eluir las proteínas Cry9 resultó tóxico (100% de mortalidad) frente a la especie de áfido ensayada. Este resultado fue inesperado e impidió que extrajéramos conclusiones sobre el grado de actividad de las toxinas Cry9 sobre *M. persicae*. Por ello, se está planeando ensayar distintos tampones de elución, con distinta concentración salina y pH, que nos permitan mantener las proteínas solubles y no sean tóxicos para *M. persicae*.

**Tabla 8.** Mortalidad producida en ninfas de *M. persicae* tras tres días de alimentación en solución de sacarosa al 20% y la toxina correspondiente.

| Toxina       | Concentración (µg/ml) | n <sup>1</sup> | Mortalidad (%) | Desviación estándar (Mortalidad) |
|--------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------------------------|
| Sacarosa 20% | -                     | 80             | 3,8            | 5,2                              |
| Vip3Aa45     | 100                   | 20             | 5,0            | 7,1                              |
|              | 500                   | 40             | 7,5            | 15,0                             |
|              | 1000                  | 60             | 35,0           | 24,3                             |
| Vip3Ag4      | 100                   | 20             | 0,0            | 0,0                              |
|              | 500                   | 40             | 2,5            | 5,0                              |
|              | 1000                  | 60             | 31,7           | 40,2                             |
| Vip3Ca3      | 100                   | 40             | 15,0           | 12,9                             |
|              | 400                   | 30             | 80,0           | 17,3                             |
|              | 445                   | 20             | 100,0          | 0,0                              |

<sup>1)</sup>n= número de individuos evaluados.

**Tabla 9.** Mortalidad observada en ninfas de *M. persicae* tras tres días de alimentación en solución de sacarosa al 20% y la toxina correspondiente.

| Toxina       | Concentración (µg/ml) | n <sup>1</sup> | Mortalidad (%) | Desviación estándar (Mortalidad) |
|--------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------------------------|
| Sacarosa 20% | -                     | 160            | 20,2           | 12,8                             |
| Vip3Ca1      | 50                    | 50             | 21,5           | 2,2                              |
|              | 100                   | 51             | 6,0            | 2,8                              |
|              | 200                   | 52             | 4,0            | 5,7                              |
| Vip3Ca2      | 50                    | 56             | 20,7           | 7,5                              |
|              | 200                   | 50             | 15,6           | 6,3                              |
|              | 400                   | 48             | 20,0           | 5,7                              |
| Vip3Ca3      | 50                    | 54             | 14,8           | 0,8                              |
|              | 200                   | 39             | 46,6           | 32,0                             |
|              | 400                   | 51             | 98,2           | 2,5                              |

<sup>1)</sup>n= número de individuos evaluados.

La concentración necesaria de la proteína Vip3Ca3 para matar la totalidad de los insectos se encuentra en torno a 450 µg/ml. Inicialmente puede parecer una concentración muy elevada si la comparamos con las empleadas en el control lepidópteros; sin embargo, valores de similares (125-500 µg/ml) fueron descritos en

otros trabajos (Porcar *et al.*, 2009). Una de las hipótesis que apoyan estos resultados sería que *B. thuringiensis* no ha evolucionado naturalmente para matar organismos con el sistema de alimentación propio de los hemípteros y, por tanto, toda actividad tóxica es fruto del azar. Hasta la fecha, se ha descrito actividad tóxica en diferentes especies de pulgones para las toxinas Cry2, Cry3A, Cry4A, Cry11A, Cry3A, Vip1-Vip2 (Chougule y Bonning, 2012). La baja susceptibilidad de los pulgones a proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* puede deberse a las condiciones del tubo digestivo de estos insectos, con un pH no suficientemente básico para producir una solubilización adecuada de las proteínas y sin las proteasas necesarias para procesar las protoxinas (Chougule y Bonning, 2012). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que existen receptores a las toxinas Cry1Ac y Cry3Aa en las células epiteliales de la especie de áfido *Acyrtosiphon pisum* (Li *et al.*, 2011), por tanto, la búsqueda de proteínas activas suficientemente tóxicas contra este grupo de insectos es un camino prometedor. De hecho, recientemente se ha descrito y patentado la proteína Cry51Aa2, que resulta suficientemente tóxica frente a hemípteros como para ser producida en plantas transgénicas de algodón y reducir la capacidad reproductora de los insectos diana, la especie de Míridos *Ligus hesperus* (Baum *et al.*, 2012). Particularmente interesante es el hecho de que las proteínas Vip3Ca1 y Vip3Ca2, que tan sólo difieren de la proteína Vip3Ca3 en dos mutaciones puntuales en su secuencia de aminoácidos que producen sustituciones no sinónimas (Palma *et al.*, 2012). El cambio conformacional producido por estas mutaciones parece ser suficiente para eliminar su actividad tóxica frente al pulgón *M. persicae*.

En resumen, con el objetivo de profundizar en el estudio de las toxinas producidas por *B. thuringiensis*, se han producido tres proteínas Cry9 con actividad tóxica para tres especies de lepidópteros de importancia como plaga agrícola y se ha detectado una proteína Vip3 que muestra toxicidad frente a áfidos. Este estudio puede contribuir al desarrollo de bioinsecticidas que contengan toxinas Cry9 y que sean activas contra plagas de importancia económica en la agricultura. Además, la caracterización de genes tóxicos *cry9* abre la puerta para investigar en la producción de nuevos genotipos de plantas transformadas con estos. Estas estrategias pueden contribuir a minimizar el riesgo de desarrollo de resistencias por parte de los insectos plaga diana de las toxinas Cry, por tanto, contribuyendo a un adecuado manejo integrado de plagas.

## 6. CONCLUSIONES

- En este trabajo, se han detectado genes *cry9* en 11 de las 13 cepas de *Bacillus thuringiensis* seleccionadas, lo que supone una frecuencia de genes elevada en comparación con las descritas en otras colecciones.
- Las proteínas Cry9B, Cry9D y Cry9E fueron producidas con éxito en bacterias recombinantes y purificadas mediante columnas de afinidad, si bien, el rendimiento obtenido en este proceso no fue elevado.
- Las proteínas Cry9B, Cry9D y Cry9E han resultado altamente tóxicas frente a las especies plaga *Chrysodeixis chalcites*, *Mamestra brassicae* y *Ostrinia nubilalis*, en ensayos de contaminación superficial de la dieta a una concentración de 1 µg/cm<sup>2</sup>.
- Se ha detectado una elevada toxicidad de la proteína Vip3Ca3 frente a *Myzus persicae*, ampliando el espectro de actividad conocido para las toxinas producidas por *B. thuringiensis*.
- Las proteínas estudiadas en este trabajo son firmes candidatas para el desarrollo de nuevos formulados bioinsecticidas o plantas transgénicas cuyo insecto diana sean las especies frente a las que muestran elevada toxicidad.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Baum, J.A., Sukuru, U.R., Penn, S.R., Meyer, S.E., Subbarao, S., Shi, X., *et al.* (2012) Cotton plants expressing a hemipteran-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs. *J Econ Entomol* **105**: 616-624.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., *et al.* (1997) Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4883-4890.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., *et al.* (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-formation toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* **1667**: 38-46.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A. *et al.* (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4965-4972.
- Chougule, N.P., and Bonning, B.C. (2012) Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. *Toxins* **4**: 405-429.
- Crickmore, N. (2006) Beyond the spore- past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *J Appl Microbiol* **101**: 616-619.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., *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, D., Baum, J., *et al.* (2012) "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature". URL [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)
- Domínguez, E., Lopez-Cepero, J., Nogueroles, C. (2012) Identificación y control de plagas y enfermedades. En *Calidad y sostenibilidad en el cultivo de la platanera en Canarias*. Nogueroles, C. (ed). Tenerife: Asprocan, pp. 144-170.

- Dong, F., Shi, R., Zhang, T.Z., Wu, G., Shen, J., Liu, Z. (2012) Fusing the vegetative insecticidal protein Vip3Aa7 and the N terminus of Cry9Ca improves toxicity against *Plutella xylostella* larvae. *Appl Microbiol Biotech* DOI: 10.1007/s00253-012-4213-y
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., and Koziel, M.G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5389-5394.
- Faria, C.A., Wäckers, F.L., Pritchard, J., Barret, D.A., and Turlings, T.C.J. (2007) High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteran pests. *PLoS ONE* **2**: e600 DOI: 10.1371/journal.pone.0000600.
- van Frankenhuyzen, K. (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol* **10**: 1-16.
- van Frankenhuyzen, K., Gringorten, L., and Gauthier, D. (1997) Cry9Ca1 toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with high activity against the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). *Appl Environ Microbiol* **63**: 4132-4134.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., and Dickerson, W.A. (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial diet. *J Econ Entomol* **69**: 487-488.
- Hua, G., Masson, L., Jurat-Fuentes, J.L., Schwab, G., and 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.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M.D., Andrew, R., Murillo, J., Ferré, J., and Caballero, P. (1998) Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Syst Appl Microbiol* **21**: 97-106.
- Ishiwata, S (1901) On a kind of severe flacherie (soto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* **114**: 1-5.
- Lambert, B., Buysse, L., Decock, C., Jansens, S., Piens, C., Saey, B., et al. (1996) A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with high activity against members of the family Noctuidae. *Appl Environ Microbiol* **62**: 80-86.

- Li, H., and Bouwer G. (2012) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *J Invertebr Pathol* **109**: 110-116.
- Li, H., Chougule, N.P., and Bonning, B.C. (2011) Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *J Invertebr Pathol* **107**: 69-78.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS Genet* **17**: 193-199.
- de Maagd R.A., Weemen-Hendriks, M., Molthoff, J.W., and Naimov, S. (2003) Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins against *Agrotis ipsilon*. *Arch Microbiol* **179**: 363-367.
- Meissle, M., Romeis, J., and Bigler, F. (2011) Bt maize and integrated pest management- a European perspective. *Pest Manag Sci* **67**: 1049-1058.
- Mollá, O., González-Cabrera, J., and Urbaneja, A. (2011) The combined use of *Bacillus thuringiensis* and *Nesidiocoris tenuis* against the tomato borer *Tuta absoluta*. *BioControl* **56**: 883-891.
- Palma, L., Hernández-Rodríguez, C.S., Maeztu, M., Hernández-Martínez, P., Ruiz de Escudero, I., Escriche, B. *et al.* (2012) Vip3C, a novel class of vegetative insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* DOI: 10.1128/AEM.01360-12.
- Patel, H.K., Jani, J.J., and Vyas, H.G. (2009) Isolation and characterization of Lepidopteran specific *Bacillus thuringiensis*. *Int J Integ Biol* **6**: 121-126.
- Porcar, M., Grenier, AM., Federici, B., and Rahbé, Y. (2009) Effects of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Appl Environ Microbiol* **75**: 4897-4900.
- Ruiz de Escudero, I., Estela, A., Escriche, B., and Caballero, P. (2007) Potential of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir for the control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), a major pest of grape plants. *Appl Environ Microbiol* **73**: 337-340.
- Sadeghi, A., van Damme, E.M., and Smagghe, G. (2009) Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *J Insect Sci* **9**: 65.

- Sattar, S., and Maiti, M.K. (2011) Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *J Microbiol Biotechnol* **21**: 937-946.
- Sauka, D.H., y Benintende, G.B. (2008) *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev Argent Microbiol* **40**: 124-140.
- Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 775–806.
- Seifinejad, A., Salehi-Jouzani, G.R., Hosseinzadeh, A., and Abdmishani, C. (2008) Characterization of lepidopteran-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Biol Control* **44**: 216-226.
- Silva-Werneck, J.O., and Ellar, D.J. (2008) Characterization of a novel Cry9Bb  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*, **98**: 320-328.
- Sneath, P.H.A. (1986) Sporeforming gram-positive rods and cocci,. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Butler, J.P. (ed). Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 1104-1207
- Smulevitch, S., Osterman, A., Shevelev, A., Kaluger, S., Karasin, A., Kadyrov, R., *et al.* (1991) Nucleotide sequence of a novel delta-endotoxin gene *crylg* of *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae*. *FEBS Lett* **293**: 25-8.
- Tabashnik, B.E., Huang, F., Ghimire, M.N., Leonard, B.R., Siegfried, B.D., Rangasamy, M., *et al.* (2011) Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnol* **29**: 1128-1131.
- Thammasittirong, A., and Attathom, T. (2008) PCR-based method for the detection of *cry* genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. *J Invertebr Pathol* **98**: 121-126.
- Vachon, V., Laprade, R., and 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.
- Walters, F.S., and English, L.H. (1995) Toxicity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomol Exp Appl* **77**: 211–216.

Whiteley, H.R., and Schnepf, H.E. (1986) The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Microbiol* **40**: 549-576.