

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO



**Caracterización de la cepa *Bacillus thuringiensis*
LBIT-1200 y estudio de los factores de virulencia
relacionados con su toxicidad**

Tesis que presenta

MC. Yaritza Reinoso Pozo

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Bioteología de Plantas

Director de tesis: Dr. Jorge E. Ibarra Rendón

Irapuato, Guanajuato

Diciembre 2016

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jorge E. Ibarra Rendón en el Laboratorio de Bioinsecticidas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, en la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Sinodales

Dra. Gabriela Olmedo

Dra. Laila P. Partida

Dra. Cristina del Rincón Castro

Dr. Víctor Olalde Portugal

DEDICATORIAS

A ti Richín que llenas mis días de luz con tu sonrisa, te amo hijo mío..

A mis padres por todo su apoyo, sin ellos este logro no fuera posible, gracias por todas las enseñanzas, por todo el amor y por toda la paciencia. Han sido ustedes mi mayor ejemplo a seguir. Los quiero mucho.

A mi querida tía Zoila América Pozo Rizo, no puedes estar presente para observar el final de este largo camino pero tu espíritu de lucha me acompaña siempre, no te olvido...

A toda mi familia por contar siempre con su afecto y apoyo incondicional. A mi hermana Maybeth, mis tíos Ale, Lore, Xiomara, Jorge y Rodolfo, mis primos Ara, Tati, Rodolfo, Alain, Michel, Indira, Gabriel, Giova, Gladie, Esther, Vidal, mis abuelos y a todos mis amigos de Cuba que siempre estuvieron pendientes de mis aventuras y desventuras por estas tierras.

AGRADECIMIENTOS

Al gobierno de México por brindarme la oportunidad de estudiar en este maravilloso país a pesar de ser extranjera

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (Número de Registro 281906)

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato por ofrecerme las facilidades para llevar a cabo mis estudios de Doctorado

A mi Director de Tesis, el Dr. Jorge E. Ibarra Rendón por su confianza y sus enseñanzas, por aceptarme en el laboratorio, por su paciencia y sus consejos durante todo el desarrollo de mi proyecto de tesis. Por toda su ayuda incondicional.

A todos los miembros de mi comité, mis asesores: Dra. Gabriela Olmedo, Dra. Laila P. Partida, Dra. Cristina del Rincón Castro y el Dr. Víctor Olalde, por todo su apoyo, sus aportes al proyecto de investigación desarrollado durante estos cuatro años, su comprensión y amabilidad.

A la M.C. Regina Basurto, por ser sus enseñanzas y por ser también un poco nuestra madre en el laboratorio.

Al Ing. M. C Javier Luévano Borroel por su amistad incondicional y por toda su ayuda en los bioensayos que realicé durante mi tesis. Al Dr. Lino Sánchez y al Laboratorio de Microscopía del CINVESTAV-Irapuato por su colaboración con los aspectos de microscopía electrónica.

Al M. C Leandro Gabriel Ordóñez Acevedo, por todo el apoyo técnico brindado en diversos aspectos moleculares durante el desarrollo de la tesis.

A Lulú y toda su familia que me acogieron como un miembro más y me brindaron todo su amor. A sus hermanas, a sus hijos y sobrinos por todos los buenos momentos que pasamos en familia. Porque no hay nada como sentirse en casa aun estando lejos de ella.

A ti Carlos, amor mío, por ser mi amigo, mi compañero, mi confidente, por todo el apoyo que me has brindado en estos años y por estar siempre a mi lado. Te quiero.

A mi amiga Mayra, por todo su cariño, aunque nos separe la distancia sabes que tengo un lugar especial para ti en mi corazón.

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Bioinsecticidas, Javi, Migue, Sonny, Nadín, Juve, Paco, Maggi, Eliana, Katy, Luis, Rosi, Mariana, Moni, Sebas, Pris y Gabriel por su apoyo y por lograr que la estancia en el laboratorio fuera mucho más que experimentos y bioensayos.

A mi amigo Eduardo Castelo, sin tu ayuda no hubiera llegado a tiempo a México, te agradezco eternamente a ti a toda tu familia por la calurosa bienvenida.

A Humberto y Doña Alicia por su amistad, por su ayuda, por los deliciosos almuerzos

A los miembros del sindicato de la administración pasada, por todo su apoyo con mis cuestiones de salud, mi eterno agradecimiento

A todos los miembros de la Secretaría Académica, a Dora y a Diana por su ayuda con mis trámites migratorios y demás asuntos académicos

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I INTRODUCCIÓN	4
II ANTECEDENTES	6
II 1. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
II 2. Generalidades y ciclo de vida de <i>B. thuringiensis</i>	8
II 3. Proteínas Cry de tres dominios. Características y modo de acción.	10
II 4. Proteínas Cyt. Características y modo de acción.....	15
II 5. Proteínas Vip. Características y modo de acción.....	17
II 6. Thuringiensina.....	20
II 7. Otros factores de virulencia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
II 8. Caracterización de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
II 9. Mutagénesis dirigida.....	28
II 10. Aplicaciones biotecnológicas de <i>Bacillus thuringiensis</i> y las proteínas Cry.....	30
III JUSTIFICACIÓN	32
IV Hipótesis	32
V OBJETIVOS.....	33
V1. OBJETIVO GENERAL	33
V2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	34
VI 1. Cepas bacterianas.....	34
VI 2. Evaluación de la toxicidad <i>Bacillus thuringiensis</i> LBIT-1200 mediante bioensayos preliminares.....	34
VI 3. Bioensayos con lepidópteros para determinar la concentración letal media (CL ₅₀) empleando el complejo spora-cristal.....	36
VI 4. Bioensayos con lepidópteros para determinar la concentración letal media (CL ₅₀) empleando cristales puros	37
VI 5. Determinación de la morfología de los cristales de la cepa LBIT-1200.....	38
VI 6. Análisis del contenido proteico de los cristales de la cepa LBIT-1200	38
VI 7. Serotipificación	39

VI 8. Detección de β -exotoxinas	39
VI 9. Extracción de DNA genómico	40
VI 10. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la flagelina	40
VI 11. Análisis de secuencias multilocus	41
VI 12. Rep-PCR	43
VI 13. Análisis del perfil de plásmidos de bajo peso molecular	44
VI 14. Detección e identificación de genes <i>vip</i>	45
VI 15. Análisis de la secuencia de los genes que condifican para la subunidad 16s del RNA ribosomal y la subunidad B de la gisrasa (<i>gyrB</i>)	46
VI 16. Detección de genes <i>cry</i> con iniciadores universales	47
VI 17. Clonación, análisis de restricción, secuenciación y análisis de secuencia de los fragmentos de genes <i>cry</i> obtenidos	48
VI 18. Diseño de iniciadores para la amplificación de genes <i>cry</i> completos y análisis de secuencia.	49
VI 19. Mutagénesis dirigida	50
VI 19.1. Mutagénesis dirigida. Diseño de iniciadores	50
VI 19.2. Mutagénesis dirigida. Obtención de genes mutados mediante PCR	53
VI 20. Expresión de proteínas mutantes en la cepa acrístálfera LBIT-601	54
VI 21. Microscopía electrónica de cepas de <i>B. thuringiensis</i> mutantes	55
VI 22. Bioensayos para determinar la CL_{50} de las cepas mutantes frente a <i>M. sexta</i> y <i>T. ni</i>	56
VII RESULTADOS	57
VII 1. Evaluación de la toxicidad <i>Bacillus thuringiensis</i> LBIT-1200 mediante bioensayos preliminares	57
VII 2. Bioensayos con lepidópteros para determinar la concentración letal media (CL_{50}) empleando el complejo espora-cristal.	58
VII 3. Bioensayos con lepidópteros para determinar la concentración letal media (CL_{50}) empleando cristales puros	59
VII 4. Determinación de la morfología de los cristales de la cepa LBIT-1200	60
VII 5. Análisis del contenido proteico de los cristales de la cepa LBIT-1200	62
VII 6. Serotipificación	62
VII 7. Detección de β -exotoxinas	63
VII 8. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la flagelina	63
VII 9. Análisis de secuencias multilocus	64

VII 10. Rep-PCR y análisis del perfil de plásmidos.....	66
VII 11. Detección e identificación de genes <i>vip</i>	67
VII 12. Análisis de la secuencia de los genes que codifican para la subunidad 16S del RNA ribosomal y la subunidad B de la girasa (<i>gyrB</i>).	68
VII 13. Detección e identificación de genes <i>cry</i> con iniciadores universales. Clonación, análisis de restricción, secuenciación y análisis de secuencia de los fragmentos de genes <i>cry</i> obtenidos.	69
VII 14. Amplificación de genes <i>cry</i> completos y análisis de secuencia.....	71
VII 16. Microscopía electrónica de cepas de <i>B. thuringiensis</i> mutantes.....	85
VII 17. Bioensayos para determinar la CL ₅₀ de las cepas mutantes frente a <i>M. sexta</i> y <i>T. ni</i>	88
VIII. DISCUSIÓN.....	90
XI. CONCLUSIONES	98
X. REFERENCIAS	99
XI. Anexos	112

Índice de Tablas

TABLA 1: LISTA DE SEROVARES TIPO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> REGISTRADOS EN EL CENTRO INTERNACIONAL DE BACILLUS ENTOMOPATÓGENOS DEL INSTITUTO PASTEUR (PARÍS, FRANCIA).	25
TABLA 2: NÚMERO DE ACCESO DE GENBANK DE LAS SECUENCIAS DE LA FLAGELINA DE DIFERENTES SEROTIPOS DE <i>B. THURINGIENSIS</i> USADOS EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL SEROTIPO DE LA CEPA LBIT-1200	42
TABLA 3: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO DE LOS INICIADORES EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS MULTILOCUS.	43
TABLA 4: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO DE LOS INICIADORES EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DE GENES <i>VIP</i> .	46
TABLA 5: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO DE LOS INICIADORES UNIVERSALES EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DE GENES <i>CRY</i> .	48
TABLA 6: INICIADORES EMPLEADOS EN LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.	52
TABLA 7. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DE LAS CEPAS LBIT-1200 Y HD-73 PARA <i>M. SEXTA</i> Y <i>T. NI</i> EMPLEANDO COMPLEJO ESPORA-CRISTAL	58
TABLA 8. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DE LAS CEPAS LBIT-1200 Y HD-73 PARA <i>M. SEXTA</i> Y <i>T. NI</i> EMPLEANDO CRISTALES PUROS.	60
TABLA 9. COMBINACIONES ALÉLICAS DE GENES CONSTITUTIVOS Y SECUENCIA TIPO DE LA CEPA LBIT-1200.	64
TABLA 10. INICIADORES EMPLEADOS PARA AMPLIFICAR EL GEN COMPLETO <i>CryIAc</i> DE LA CEPA LBIT-1200.	72
TABLA 11. TAMAÑO PROMEDIO DE LOS CRISTALES PRODUCIDOS POR CEPAS MUTANTES	85
TABLA 12. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DE LAS CEPAS MUTANTES PARA <i>M. SEXTA</i> Y <i>T. NI</i> EMPLEANDO COMPLEJO ESPORA-CRISTAL.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa Y Cry4Aa.	12
FIGURA 2. DIFERENTES MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS PARA LAS PROTEÍNAS CRY EN LEPIDÓPTEROS.	15
FIGURA 3. ESTRUCTURA TRIDEMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS Cyt1Aa, Cyt2Aa y Cyt2Ba.	16
FIGURA 4. ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	51
FIGURA 5. VECTORES DE CLONACIÓN EMPLEADOS EN EL PROCEDIMIENTO DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR PCR	51
FIGURA 6. RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS PRELIMINARES CON LA CEPA LBIT-1200 FRENTE A <i>M. SEXTA</i> Y <i>T. NI</i>	57
FIGURA 7. EFECTOS SUBLETALES EN LARVAS DE <i>T. NI</i> AL SER TRATADAS CON BAJAS CONCENTRACIONES DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL DE LA CEPA LBIT-1200	59
FIGURA 8. OBTENCIÓN DE CRISTALES PUROS DE LA CEPA LBIT-1200 EMPLEANDO GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.	60
FIGURA 9. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LOS CRISTALES DE LA CEPA LBIT-1200	61
FIGURA 10. ANÁLISIS DEL CONTENIDO PROTEICO DE LOS CRISTALES	62
FIGURA 11. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE DEL GEN <i>HAG</i>	64
FIGURA 12. ÁRBOL NEIGHBOR-JOINING DONDE SE MUESTRAN LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE DIFERENTES SEROTIPOS DE <i>B. THURINGIENSIS</i>	65
FIGURA 13. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR DE SIETE GENES CONSTITUTIVOS	66
FIGURA 14A. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LOS PATRONES DE REP-PCR DE LAS CEPAS LBIT-1200 Y HD-73.	67
FIGURA 14B. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 0.6 % DE LOS PATRONES DE PLÁSMIDOS DE LAS CEPAS LBIT-1200 Y HD-73	67

FIGURA 15A-C. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>Vip</i>	68
FIGURA 16. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LA AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR DE LOS GENES <i>GYRB</i> Y 16S DNA	69
FIGURA 17. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LA AMPLIFICACIÓN DE GENES <i>Cry</i> MEDIANTE PCR EMPLEANDO DIFERENTES COMBINACIONES DE INICIADORES UNIVERSALES	70
FIGURA 18. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE GENES <i>Cry</i> CON ENZIMAS <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>AluI</i> y <i>Sau3AI</i>	71
FIGURA 19. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>CryIac</i> COMPLETO MEDIANTE PCR.	73
FIGURA 20A. VISTA FRONTAL DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PROTEÍNA <i>Cry1Ac</i> PRODUCIDA POR LA CEPA LBIT-1200.	73
FIGURA 20B. VISTA SUPERIOR DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PROTEÍNA <i>Cry1Ac</i> PRODUCIDA POR LA CEPA LBIT-1200.	74
FIGURA 21A. ALINEAMIENTO DE LA PROTEÍNA <i>Cry1Ac</i> DE LA CEPA LBIT-1200 CON TODAS LAS PROTEÍNAS <i>Cry1Ac</i> CONOCIDAS HASTA LA FECHA. SUSTITUCIÓN M1L	75
FIGURA 21B. ALINEAMIENTO DE LA PROTEÍNA <i>Cry1Ac</i> DE LA CEPA LBIT-1200 CON TODAS LAS PROTEÍNAS <i>Cry1Ac</i> CONOCIDAS HASTA LA FECHA. SUSTITUCIÓN N547Y	76
FIGURA 21C. ALINEAMIENTO DE LA PROTEÍNA <i>Cry1Ac</i> DE LA CEPA LBIT-1200 CON TODAS LAS PROTEÍNAS <i>Cry1Ac</i> CONOCIDAS HASTA LA FECHA. SUSTITUCIÓN R602G	77
FIGURA 21D. ALINEAMIENTO DE LA PROTEÍNA <i>Cry1Ac</i> DE LA CEPA LBIT-1200 CON TODAS LAS PROTEÍNAS <i>Cry1Ac</i> CONOCIDAS HASTA LA FECHA. SUSTITUCIÓN L867F	78
FIGURA 22. RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE DIFERENTES PROTEÍNAS <i>Cry1Ac</i> .	79
FIGURA 23. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA δ -ENDOTOXINA <i>Cry1Ac</i> DE LA CEPA LBIT-1200. EL LAZO DEL DOMINIO III EN EL QUE SE ECUENTRA LA SUSTITUCIÓN N547Y SE RESALTA DE COLOR AZUL	80
FIGURA 24. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA δ -ENDOTOXINA <i>Cry1Ac</i> DE LA CEPA LBIT-1200. LA CADENA β DEL DOMINIO III EN LA QUE SE ENCUENTRA LA SUSTITUCIÓN R602G SE RESALTA EN COLOR AZUL.	81

FIGURA 25. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>cry1Ac1</i> DE HD-73 MEDIANTE PCR.	82
FIGURA 26. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 % DE LA CONSTRUCCIÓN pJET 1.2+ <i>cry1Ac1</i>	83
FIGURA 27. ANÁLISIS DE SECUENCIAS PARA LA DETECCIÓN DE CLONAS MUTADAS EN EL PROGRAMA SNAPGENE. A: CLONA POSITIVA N547Y, B CLONA POSITIVA R602G.	83
FIGURA 28. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1%. A: DIGESTIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN pJET 1.2 + <i>cry1ac</i> . B: LIGACIÓN DE GENES MUTADOS AL VECTOS pSTAB Y DIGESTIÓN DE LA NUEVA CONSTRUCCIÓN.	84
FIGURA 29A. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LOS CRISTALES DE LA CEPA MUTANTE N547Y MEDIANTE TINCIÓN NEGATIVA Y MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN.	86
FIGURA 29B. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LOS CRISTALES DE LA CEPA MUTANTE R602G MEDIANTE TINCIÓN NEGATIVA Y MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN.	86
FIGURA 29C. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LOS CRISTALES DE LA CEPA MUTANTE QUE PRESENTA LA DOBLE MUTACIÓN N547Y Y R602G MEDIANTE TINCIÓN NEGATIVA Y MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN.	87
FIGURA 29D. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LOS CRISTALES DE LA CEPA CONTROL CRY ⁻ B QUE EXPRESA LA PROTEÍNA Cry1Ac1 DE HD-73 MEDIANTE TINCIÓN NEGATIVA Y MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN.	87

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es considerada la bacteria entomopatógena por excelencia y ha sido empleada por más de 50 años en el control biológico de insectos vectores de enfermedades e insectos que constituyen plagas agrícolas. La actividad insecticida de *B. thuringiensis* se debe a la producción de inclusiones cristalinas de naturaleza proteica durante la fase de esporulación. Estas proteínas pueden ser de dos tipos: proteínas Cry y proteínas Cyt. Las proteínas Cry son el grupo más abundante de proteínas insecticidas producidas por *B. thuringiensis*. Hasta la fecha se han identificado y caracterizado más de 70 holotipos distintos, sin embargo sólo un pequeño porcentaje de estas toxinas muestran toxicidad hacia ciertos órdenes de insectos, y de este grupo de proteínas un porcentaje aún más pequeño es considerado como altamente tóxicas. En nuestro laboratorio contamos con una cepa nativa de *B. thuringiensis* denominada LBIT-1200 aislada de muestras de suelo que mostró en experimentos previos una alta toxicidad hacia algunos lepidópteros. Con el objetivo de realizar un estudio amplio de la cepa e identificar los factores de virulencia relacionados con su toxicidad se realizaron inicialmente bioensayos burdos para determinar su espectro toxicológico. Posteriormente se determinó la concentración letal media (CL₅₀) de la cepa para los lepidópteros susceptibles y se realizaron una serie de análisis bioquímicos, morfológicos y moleculares para su caracterización parcial. La cepa sólo mostró toxicidad a los lepidópteros *Manduca sexta*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda* en los bioensayos iniciales. No se observó efecto tóxico con altas concentraciones del complejo spora-cristal (10 mg/ml) hacia el lepidóptero *Galleria mellonella*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el díptero *Aedes aegypti* y los coleópteros *Tenebrio molitor* y *Leptinotarsa texana*. La cepa mostró valores de CL₅₀ muy bajos para *M. sexta* y *T. ni*, demostrando una toxicidad al menos cinco veces mayor que cepas estándar que se emplean para el control biológico como HD-73, HD-1 y SA11. Se determinó además que LBIT-1200 pertenece al serotipo *kurstaki*, que es una cepa auto aglutinable y que presenta muchas similitudes con la cepa HD-73. Ambas cepas tienen patrones de Rep-PCR y de plásmidos de bajo peso molecular idénticos y ambas producen únicamente proteínas Cry1Ac que se agrupan en cristales bipiramidales. Sin embargo existen algunas pequeñas diferencias entre las secuencias de algunos marcadores moleculares como el 16S rDNA y *gyrB* que nos

permiten asegurar que LBIT-1200 es una cepa original y no un reaislamiento de la cepa HD-73 de la naturaleza.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Cry de la cepa LBIT-1200 arrojó que esta posee cuatro sustituciones de aminoácidos que no se encuentran presentes en el resto de las proteínas Cry1Ac reportadas hasta la fecha. Dos de estas sustituciones se localizan en el dominio III de la δ -endotoxina, mientras que las dos restantes se encuentran en el extremo carboxilo terminal y en el codón de inicio respectivamente. La secuencia de esta proteína se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso KT18353 y se le asignó el nombre de Cry1Ac39 por el Comité de Nomenclatura de Toxinas producidas por *B. thuringiensis*. Teniendo en cuenta las semejanzas observadas entre LBIT-1200 y HD-73 se decidió insertar mediante mutagénesis dirigida estas sustituciones de aminoácidos en la proteína Cry1Ac1 producida por HD-73. Las proteínas mutantes se expresaron en una cepa acristalífera de *B. thuringiensis* y estas cepas mutadas se emplearon para realizar bioensayos y determinar la CL_{50} de cada una de ellas. En total se obtuvieron tres mutantes: dos con las mutaciones N547Y y R602G respectivamente y una tercera con la doble mutación. Se generaron además controles que expresaran únicamente las proteínas Cry1Ac nativas de las cepas HD-73 y LBIT-1200.

Los resultados de los bioensayos mostraron que la doble mutante es aproximadamente un 20 % más tóxica, en comparación con la mutante R602G, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre la mutante N547Y y la doble. La mutante N547Y tiene una mayor contribución a la toxicidad de la proteína que la mutación R602G, sin embargo se observaron diferencias significativas entre la cepa control que expresaba la proteínasCry1Ac1 de HD-73 y la mutante R602G. Estos datos indican que la alta toxicidad de la cepa LBIT-1200 se debe a la presencia conjunta de las sustituciones de aminoácidos N547Y y R602G.

ABSTRACT

The LBIT-1200 strain of *Bacillus thuringiensis* was recently isolated from soil, and showed a 6.4 and 9.5 increase in toxicity, against *Manduca sexta* and *Trichoplusia ni*, respectively, compared with HD-73. However, LBIT-1200 was still highly similar to HD-73, including the production of bipyramidal crystals containing only one protein of ~130,000 kDa, its flagellin gene sequence related to the *kurstaki* serotype, plasmid and Rep-PCR patterns similar to HD-73, lack of β -exotoxin production and absence of *vip* genes. Sequencing of the *cry* gene of LBIT-1200 strain showed the presence of four amino acid differences, including two amino acid replacements in domain III, compared to Cry1Ac1, which may explain its higher toxicity. Amino acids substitutions in domain II were introduced in Cry1Ac1 protein. Three mutants were obtained for bioassays. N547Y mutant and double mutant expressing N547Y and R602G mutations showed high toxicity. The amino acid at position N547Y is related with LBIT-1200 high toxicity to *M. sexta* and *T. ni*. In conclusion, the LBIT-1200 strain is a variant of the HD-73 strain but shows at least five times higher toxicity, which makes this new strain an important candidate to be developed as a bioinsecticide, once it passes other tests, throughout its biotechnological development.

I INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (Berliner) es una bacteria Gram positiva y aerobia que ha sido utilizada por más de 50 años en el control biológico de insectos plaga por lo que considera que es la bacteria bioinsecticida por excelencia. La actividad insecticida de *B. thuringiensis* se debe a la formación de inclusiones proteicas que se forman durante el proceso de esporulación. Estas inclusiones poseen diferentes morfologías y pueden estar constituidas por proteínas Cry o Cyt que también se denominan δ -endotoxinas (Ruiu, 2015).

Las proteínas Cry constituyen el grupo más amplio de proteínas insecticidas producidas por *B. thuringiensis*. Hasta la fecha se han descrito más de 70 holotipos de estas proteínas y a su vez existen diferentes grupos de proteínas que corresponden a un mismo holotipo de acuerdo a los niveles de clasificación que existen. Cada año esta cifra aumenta con el descubrimiento de nuevas proteínas Cry ya que estas toxinas son consideradas como los principales factores de virulencia de *B. thuringiensis*. A pesar del gran número de proteínas Cry que existen, menos del 10 % de estas son tóxicas hacia insectos determinados y de este pequeño grupo de proteínas sólo unas pocas son altamente tóxicas y por tanto consideradas para el control biológico (Elleuch *et al.*, 2016).

Además de las δ -endotoxinas *B. thuringiensis* produce otros factores de virulencia que le permiten afectar a los insectos susceptibles con mayor facilidad. Entre estos se destacan: las proteínas Vip, la β -exotoxina y las enzimas quitinolíticas. Juntos estos compuestos forman parte de un gran arsenal que posee *B. thuringiensis* para eliminar a diferentes insectos blanco y otros microorganismos como nemátodos (Salazar-Marroquín *et al.*, 2016). A diferencia del resto de los miembros que constituyen el grupo *cereus* del género *Bacillus* *B. thuringiensis* es una especie que presenta una gran variabilidad genética. Esta variabilidad se aprecia por la presencia de diferentes genes *cry* y desde el punto de vista toxicológico, ya que las cepas pueden mostrar efectos tóxicos hacia insectos de diferentes órdenes (García *et al.*, 2015).

A pesar de que *B. thuringiensis* ha sido la bacteria entomopatógena más estudiada existe todavía gran interés por parte de algunos grupos de investigación en este microorganismo, en aspectos ecológicos, genéticos y de patogenicidad. Las principales investigaciones en este sentido van dirigida hacia: el estudio de los mecanismos de acción de las proteínas Cry y la identificación de sus receptores, el desarrollo de plantas transgénicas y el desarrollo de nuevos bioproductos a partir de cepas que contengan nuevos genes *cry* y que posean un alta toxicidad.

En el presente trabajo se aisló y caracterizó una cepa nativa de *B. thuringiensis* a la cual se denominó LBIT-1200. Se evaluó el efecto tóxico de la cepa hacia insectos de diferentes órdenes y un nemátodo. Se determinó la concentración letal media de la cepa frente a los insectos susceptibles y se identificó un gen *cry* presente en la misma.

II ANTECEDENTES

II 1. Historia de *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (Bt) fue aislado por primera vez a partir de larvas enfermas del lepidóptero *Bombyx mori* (Linnaeus) por el bacteriólogo japonés Shigetane Ishiwata en 1901, quien denominó “sotto kin” a la enfermedad identificada. Ishiwata describió las características del cultivo de esa bacteria así como la patología que causaba en las larvas de *B. mori*, sin embargo estos trabajos escritos en japonés, tuvieron poca repercusión internacional. Algo más de una década después el alemán Ernst Berliner publicó la descripción de una bacteria similar aislada cuatro años antes en la región alemana de Thüringen a partir de larvas enfermas de la palomilla del mediterráneo de la harina *Ephestia kuehniella* (Zeller) y la nombró *Bacillus thuringiensis* en honor a su procedencia (Berliner, 1915).

Posteriormente Aoki y Chigasaki (1916) publicaron una descripción detallada de la bacteria aislada por Ishiwata y le dieron el nombre de *Bacillus sotto*, resaltando en su publicación que su actividad tóxica se debía a una toxina que sólo estaba presente en los cultivos esporulados y no en las células vegetativas. En 1915 Berliner reportó la presencia de inclusiones parasporales en el interior de Bt, pero la actividad de estas inclusiones no sería descubierta hasta mucho tiempo después. A pesar de que se conocía muy poco sobre la biología básica de Bt en aquella época, se demostró que era altamente patogénico en larvas de diferentes especies de lepidópteros.

Debido a que todavía no se habían desarrollado los insecticidas sintéticos, los agricultores comenzaron a utilizar a Bt como insecticida en 1920. El primer reporte del uso de Bt para el control de plagas de insectos fue en Hungría a finales de la década de 1920 (Husz, 1928) y en la antigua Yugoslavia a finales de 1930. Durante las siguientes dos décadas se realizaron varias pruebas de campo en Estados Unidos y Europa para evaluar la efectividad de Bt para el control de plagas de lepidópteros y los resultados favorecieron el desarrollo del primer producto comercial llamado Sporeine[®] fabricado por los laboratorios

Libec de Francia. El producto se empleó principalmente para el control de palomillas de la harina sin embargo con el advenimiento de la segunda guerra mundial no se continuó su uso (Sansinenea, 2012).

Al terminar la segunda guerra mundial se le dio una amplia prioridad al uso de los nuevos insecticidas sintéticos, liderados por el DDT. Estos últimos se empleaban de manera indiscriminada ya que eliminaban a los insectos en cualquiera de sus estadios de desarrollo. Como consecuencia las poblaciones de insectos benéficos disminuyeron considerablemente y las poblaciones de insectos plaga comenzaron a resurgir debido a la eliminación de sus enemigos naturales. Además, serios problemas medioambientales y de salud comenzaron a surgir debido a la presencia de estos insecticidas químicos en el aire, el agua e incluso en los alimentos. Para contrarrestar estos efectos negativos se encaminaron los esfuerzos hacia el uso de métodos de control más amigables con el medio ambiente (Pingali, 2012).

El resurgimiento del interés en Bt como bioinsecticida se le atribuye al investigador Edward Steinhaus quién utilizó a la bacteria con éxito para eliminar larvas del lepidóptero *Colias eurytheme* (Steinhaus, 1951) y además se percató de que la espora de Bt se encontraba en posición lateral a diferencia de la mayoría de las bacterias esporuladas que se conocían en aquella época y que poseían una espora central (Steinhaus, 1954). Posteriormente los investigadores Hannay, Fitz-James (1955) y Angus (1954) descubrieron que la actividad insecticida de Bt hacia lepidópteros se debía a inclusiones cristalinas que se producían durante la fase de esporulación de la bacteria. Con este descubrimiento se incrementó el interés en la estructura de estos cristales, la bioquímica y el ciclo de vida de Bt y se sentaron las bases para el desarrollo de nuevas formulaciones y fue así que en 1957 se comenzó a comercializar el producto Thuricide[®]. Posteriormente en 1970 los laboratorios Abbot desarrollaron el bioinsecticida Dipel[®], a partir de una cepa de Bt mucho más tóxica y con un amplio rango de toxicidad hacia larvas de diferentes especies de lepidópteros entre los que se encuentran: *Trichoplusia ni*, *Helicoverpa zea*, *Heliiothis virescens*, *Lymantria dispar*, entre muchas otras (Milner, 1994).

Debido al éxito de Bt como agente de control biológico de algunas especies de lepidópteros los investigadores continuaron la búsqueda de nuevas cepas de la bacteria.

Goldberg y Margalit en 1976 descubrieron una cepa de Bt que tenía efecto tóxico hacia larvas de mosquitos. Debido a la especificidad y alta toxicidad de esta cepa hacia larvas de mosquitos se comenzó a producir formulaciones con esta nueva cepa para sustituir los insecticidas químicos empleados usualmente para el eliminar mosquitos. Posteriormente en Alemania se descubrió otra prometedora cepa de Bt con toxicidad hacia coleópteros (Krieg *et al.*, 2009). Estas nuevas cepas y otras aisladas más tarde se usan todavía en la actualidad para el control biológico tanto de plagas de insectos de diferentes órdenes como de mosquitos vectores de enfermedades.

Uno de los avances más importantes en la historia de Bt como agente de control biológico es el desarrollo de plantas transgénicas que expresan toxinas de la bacteria. Desde 1996 algunos cultivos de importancia económica como el maíz, la soya y el algodón son transformados genéticamente y comercializados de manera tal que expresaran las toxinas de Bt y de esta manera hacerlos resistentes a las principales plagas que azotan a estos cultivos (Crickmore, 2006). Estos cultivos transgénicos actualmente son los segundos con mayor distribución a nivel mundial y presentan grandes beneficios como: uso reducido de insecticidas químicos, eliminación total de algunas plagas a nivel regional y mayor rendimiento en las cosechas (Tabashnik, 2015).

II 2. Generalidades y ciclo de vida de *B. thuringiensis*.

B. thuringiensis es una bacteria aerobia y Gram positiva, cuyo ciclo de vida se divide en dos fases: crecimiento vegetativo y esporulación. Durante la fase de crecimiento vegetativo las células de Bt se dividen activamente por fisión binaria y se obtienen dos células idénticas con forma de barra con extremos romos de aproximadamente 3 μm de largo y aproximadamente 1.2 μm de ancho. Posteriormente con el agotamiento de los nutrientes comienza la fase de esporulación durante la cual se forman esporas e inclusiones parasporales de naturaleza proteica conocidas también como cristales parasporales. Estos cristales pueden poseer diferentes morfologías: bipiramidal, cúbicas, esféricas y amorfas son algunas de las más comunes y poseen actividad tóxica hacia insectos de diferentes órdenes. Los cristales de Bt pueden estar constituidos por dos tipos de proteínas: Cry y Cyt (Sauka y Benintende, 2008).

Taxonómicamente Bt se ubica en la familia Bacillaceae y pertenece al Grupo I del género *Bacillus*, donde se encuentra el llamado grupo *cereus* en el cual se encuentran incluidas también las especies *B. cereus*, *B. mycooides* y *B. pseudomycooides*, caracterizados por su crecimiento rizomorfo en medios de cultivo sólidos, *B. anthracis*, el agente etiológico del ántrax y la especie tolerante a bajas temperaturas *B. weihenstephanensis*. Existe una estrecha relación genética entre *B. cereus*, *B. anthracis* y Bt por lo que la designación de Bt como especie única ha estado sometida a discusión. A pesar de esto se reconoce la individualidad de Bt como especie basándose en la presencia del cristal parasporal (Vilas-Bôas *et al.*, 2007).

Los numerosos programas de búsqueda de cepas de Bt han permitido aislar esporas de esta especie en diversos ecosistemas entre los que se destacan: suelo, superficies vegetales, cadáveres de insectos, granos almacenados, agua, ecosistemas acuáticos, etc. Por ello en la actualidad Bt se considera una especie ubicua y cosmopolita (Morris-Coole, 1995). A pesar de que Bt se encuentra en la naturaleza se puede añadir a diferentes ecosistemas mediante las diferentes aplicaciones foliares para el control biológico de plagas de insectos, es por esto que su prevalencia en la naturaleza se puede definir como “natural” y “artificial” (Osman *et al.*, 2015).

Algunos investigadores consideran a Bt como un microorganismo del suelo debido a que su aislamiento a través de los años ha sido principalmente a partir de este ambiente. Otros investigadores consideran que el suelo es solamente un sitio de almacenamiento de esporas de Bt, ya que raramente puede esporular en este sitio debido a los requerimientos nutricionales especiales para la germinación de las esporas y el crecimiento vegetativo de las células, considerando que la microbiota, las propiedades del suelo, el pH, la humedad y la concentración de minerales y materia orgánica tienen un efecto directo en la sobrevivencia de Bt en este ambiente (Argôlo-Filho & Lopes, 2014). Otro grupo de investigadores se inclinan por la capacidad de Bt para colonizar cadáveres de insectos y han demostrado que puede tener un ciclo de vida necrotrófico, lo cual puede ser de gran importancia para asegurar la proliferación y dispersión de la bacteria en el medio ambiente (Dubois *et al.*, 2012).

Además algunos estudios también han demostrado que Bt puede colonizar la rizósfera y se asume que la eficiente colonización de las raíces puede deberse a la disponibilidad de nutrientes en esta zona de las plantas (Park *et al.*, 2008). Algunos estudios en repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) han reportado la exitosa colonización endofítica de Bt en plántulas, encontrándose células vegetativas, esporas e incluso cristales en varias partes de las plántulas. Se cree que Bt puede penetrar en estas a través de las raíces mediante la secreción de enzimas hidrolíticas o a través de pequeñas heridas (Gomes *et al.*, 2012).

En realidad, el papel real que juega esta bacteria en el medio ambiente no es del todo conocido, precisamente debido a la diversidad de nichos ecológicos en los que ha sido hallada. Si bien la capacidad entomopatógena de Bt le permite colonizar insectos susceptibles y multiplicarse en un medio rico como el hemocele de los mismos, la aparición de este fenómeno a escala de epizootia es poco habitual en la naturaleza (Raymond *et al.*, 2010).

II 3. Proteínas Cry de tres dominios. Características y modo de acción.

Las proteínas Cry de tres dominios son las proteínas insecticidas mejor caracterizadas y a pesar de que existen marcadas diferencias en su secuencia de aminoácidos y su actividad biológica, las toxinas activas poseen semejanzas en su estructura tridimensional. Están codificadas por genes que se encuentran contenidos en plásmidos de Bt. Los genes *cry* son regulados a nivel transcripcional principalmente y se han clasificado de acuerdo a su regulación en: genes *cry* dependientes de la esporulación que son controlados por factores de transcripción sigma-K o sigma-E y genes *cry* cuya expresión no depende de la esporulación y que se encuentran bajo el control de otros factores de transcripción (Aronson, 2002).

Las proteínas Cry de tres dominios son proteínas globulares formadas por tres dominios estructurales, en su estado activo. Inicialmente estas proteínas se encuentran en estado inactivo, es decir, no poseen efecto tóxico ya que su activación requiere la digestión de una pequeña porción del extremo amino terminal y casi la mitad del extremo carboxilo

de la protoxina, evento fundamental para la función tóxica de la misma (Soberón y Bravo, 2007). El dominio I se encuentra situado en el extremo amino terminal y está formado por 7 hélices α (6 hélices anfipáticas rodeando a una hélice central hidrofóbica). El dominio II consiste en tres láminas β antiparalelas dispuestas en la conformación denominada prima- β . El dominio III se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la toxina activada y forma un “sandwich” de dos láminas β antiparalelas (Fig. 1) (de Maagd *et al.*, 2003).

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las toxinas activas ha revelado la presencia de 5 bloques parcialmente conservados a lo largo de la secuencia de la gran mayoría de las toxinas Cry. Estas regiones parecen ser determinantes en el plegamiento de la proteína. Además, su alto grado de conservación entre las proteínas Cry se corresponde con la similitud de su estructura tridimensional y su modo de acción (Bravo *et al.*, 2013).

Inicialmente no existía un criterio universal en la clasificación de las proteínas Cry. La clonación y secuenciación de los primeros genes *cry* en los años 80 sentó las bases para establecer en 1989 un primer sistema de clasificación. Este sistema se basaba en la secuencia de aminoácidos de la proteína y en su espectro de actividad insecticida, asignando números romanos para establecer diferencias entre los grupos de proteínas Cry (ejemplo CryI, CryII, CryIII), pero pronto quedó obsoleto ya que la clasificación en base al espectro insecticida resultaba en muchos casos inconsistente (Hofte y Whiteley, 1989). Esta circunstancia, sumada al descubrimiento de nuevas proteínas Cry con espectros de toxicidad diferentes provocó que se propusiera una revisión de la nomenclatura

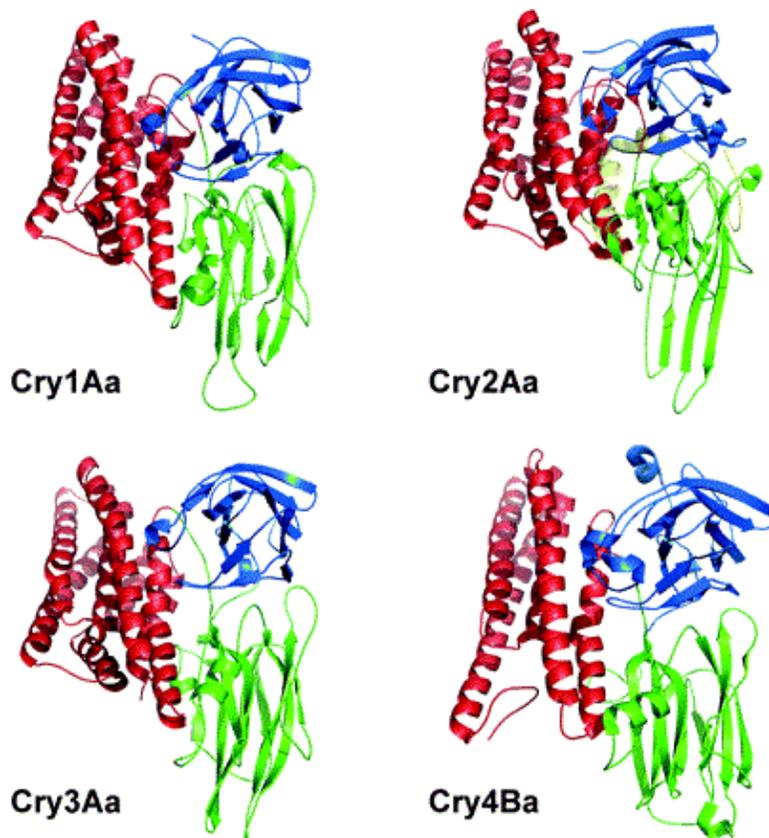


Figura 1. Estructura tridimensional de las proteínas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa y Cry4Ba tomado de Pigott y Ellar (2007). Cada uno de los dominios se representa en colores diferentes. Dominio I (rojo) Dominio II (verde) y Dominio III (azul).

El nuevo sistema de clasificación se desarrolló en base al grado de identidad de la secuencia de aminoácidos de las proteínas exclusivamente y establece toxinas holotipo únicas que se ordenan en tres rangos en base a la divergencia de sus secuencias (Crickmore, *et al.*, 1998). Esto permite la inclusión de nuevas proteínas Cry que son producidas por otros microorganismos como son: Cry16 y Cry17, producidas por *Clostridium bifermentans* y Cry18, por *Paenibacillus popilliae*. Este sistema de clasificación otorga un número arábigo a las proteínas que presentan hasta un 45% de similitud (ejemplo Cry1, Cry2, Cry3). Posteriormente se designa una letra mayúscula a aquellas proteínas que posee entre un 45 y 78% de similitud (Cry1A, Cry1B, Cry1C). Luego se asigna una letra minúscula a aquellas proteínas Cry que poseen entre 78 y 95% de similitud (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac). Finalmente se adiciona un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más del 95% de similitud (Cry1Ac1, Cry1Ac2, Cry1Ac3). La información relacionada con la

clasificación de las proteínas Cry se actualiza constantemente y se puede consultar en la siguiente dirección electrónica http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

El mecanismo de acción de las proteínas Cry ha sido muy estudiado en larvas de lepidópteros y de manera general se acepta que éstas son proteínas formadoras de poros en las membranas de las células epiteliales del intestino de los insectos susceptibles. El primer modelo que explica el efecto tóxico de las proteínas Cry plantea que las mismas ejercen su actividad tóxica al interactuar con receptores que se encuentran en las células epiteliales del intestino de las larvas. La unión de la proteína al receptor permite que estas se inserten en la membrana de las células epiteliales provocando un desequilibrio osmótico que afecta la funcionalidad de la célula, las células mueren y en consecuencia se pierde la integridad de la pared intestinal. Los primeros síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino y finalmente la muerte (Knowles *et al* 1987).

En la actualidad existen otros modelos que pretenden explicar el mecanismo de acción de las proteínas Cry basándose en evidencias moleculares y a través de los cuales se han podido identificar algunos de los receptores específicos de las mismas. Entre los receptores más estudiados se encuentran los de tipo aminopeptidasa-N, los receptores de tipo cadherina, y los receptores de tipo fosfatasa alcalina los cuales han sido identificados en lepidópteros (Bravo *et al.*, 2007) y dípteros (Likitvivatanavong *et al.*, 2011).

Las aminopeptidasas-N son una clase de enzimas que realizan cortes en aminoácidos a partir del extremo N-terminal de los polipéptidos. En el intestino de las larvas de lepidópteros, estas proteínas participan en cooperación con endopeptidasas y carboxipeptidasas para la digestión de derivados proteínicos procedentes de la dieta del insecto. Este tipo de receptores se dividen en cinco clases y se encuentran presentes en lepidópteros como *Manduca sexta*, *Plutella xilostella* (Denolf *et al.*, 1997), *B. mori* (Atsumi *et al.*, 2005), *Helicoverpa armigera* (Sivakumar *et al.*, 2007) y *Heliotis virescens* (Zhang *et al.*, 2009).

Las proteínas de la familia de las cadherinas presentan dominios de unión a calcio y usualmente se encuentran ancladas a las células. En los lepidópteros este tipo de proteínas se localizan en las células epiteliales del intestino, lugar en donde ejercen su toxicidad las proteínas Cry, sin embargo su función fisiológica exacta en este sitio no se conoce. Este tipo de receptores se han estudiado intensivamente en su interacción con proteínas Cry1A y existen evidencias que sugieren que este tipo de receptores son muy importantes en la susceptibilidad de las larvas a las proteínas Cry (Bel y Escriche, 2006).

Teniendo en cuenta el número de proteínas Cry existentes, así como los posibles receptores, no es sorprendente que el modo de acción de las proteínas Cry sea controversial (Vachon *et al.* 2012). El modelo propuesto por Bravo (2007) es una versión actualizada del modelo propuesto por Knowles (1987) y plantea que tanto los receptores de tipo cadherina como los receptores de tipo aminopeptidasa son requeridos para la toxicidad de Cry1Ac en larvas de *M. sexta*. En estudios más recientes, la teoría de que Cry1Ab produce la muerte de las células epiteliales del intestino exclusivamente mediante el mecanismo de lisis osmótica fue rechazada por algunos científicos, argumentando que la formación del poro y la citotoxicidad no han sido demostradas adecuadamente. Se demostró que la unión de Cry1Ab al receptor Bt-R1 provoca citotoxicidad a través de una vía de señalización dependiente de magnesio en las células del insecto. Esta vía involucra la estimulación de la proteína G y la adenil ciclasa, incremento de los niveles de AMPc y la activación de la proteína quinasa A. La inducción de la vía adenilciclase/proteína quinasa A provoca cambios citológicos que conducen a la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006) (Fig. 2)

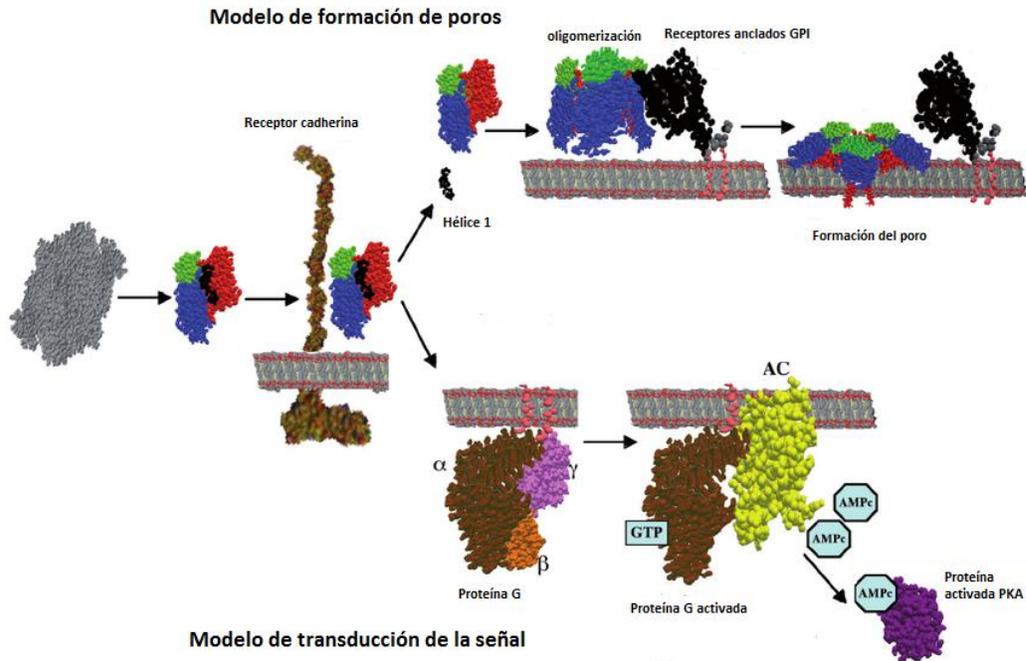


Figura 2. Diferentes mecanismos de acción propuestos para las proteínas Cry en lepidópteros tomado de Soberón y colaboradores 2009. La solubilización y la activación de las proteínas anteceden a la interacción de las mismas con receptores específicos de la membrana de las células epiteliales del intestino. La activación de una vía de señalización dependiente de Mg conduce a la muerte celular por apoptosis.

II 4. Proteínas Cyt. Características y modo de acción.

Además de las proteínas Cry, algunas cepas de Bt producen durante la fase de esporulación cristales compuestos por las proteínas Cyt. Estas están codificadas por genes presentes en el plásmido pBtoxis de *B. thuringiensis israelensis*. El primer intento de obtener un modelo de la estructura tridimensional de las proteínas Cyt fue descrito en 1988. Este modelo ofrecía información general sobre la abundancia de cadenas β y dos α -hélices antiparalelas, pero no ofreció más detalles (Butko, 2003).

Actualmente se conoce que las proteínas Cyt están constituidas estructuralmente por un único dominio en el cual las capas externas son α -hélices que rodean estructuras de láminas β plegadas (Fig 3). Su tamaño varía entre 25 y 28 kDa y existen hasta la fecha tres

grupos: Cyt1, Cyt2, Cyt3 (Soberón *et al.*, 2013). Este tipo de proteínas se han identificado en cepas de Bt con actividad mosquitocida como: *B. thuringiensis* svar. *israelensis* (Earp y Ellar, 1987) y *B. thuringiensis* svar. *kyushuensis* (Knowles *et al.*, 1992).

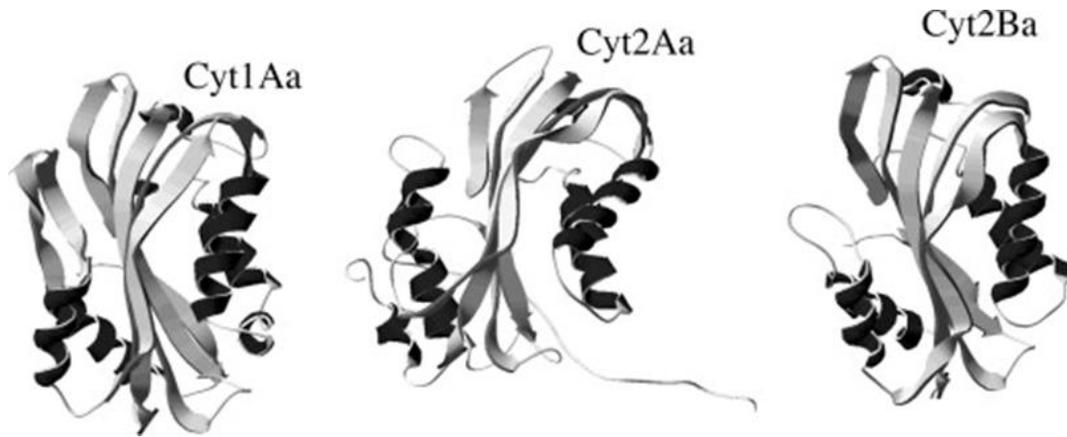


Figura 3. Estructura tridimensional de las proteínas Cyt1Aa, Cyt2Aa y Cyt2Ba tomado de Soberón y colaboradores 2013. Se muestra la presencia de un único dominio estructural.

Para la clasificación de las proteínas Cyt se utiliza la misma nomenclatura que se emplea en la clasificación de las proteínas Cry. Sin embargo no existen homologías entre las secuencias de aminoácidos de ambos grupos de δ -endotoxinas.

Las proteínas Cyt muestran toxicidad a insectos del orden Diptera *in vivo*, sin embargo se ha demostrado que este tipo de δ -endotoxinas (una vez activadas) son tóxicas *in vitro* a varias líneas celulares de mamíferos como: eritrocitos, linfocitos y fibroblastos, así como a células de otros insectos (Teixeira *et al.*, 2012).

Inicialmente las proteínas Cyt se sintetizan en forma de protoxinas que son solubilizadas en el intestino de las larvas susceptibles y activadas mediante un proceso de proteólisis que libera toxinas de 25 kDa. Las evidencias indican que las toxinas activas interactúan directamente con lípidos no saturados que se encuentran en la membrana de las células del intestino medio, sin necesidad de unirse a proteínas receptoras (Thomas y Ellar, 1983).

Para explicar el mecanismo de acción de las proteínas Cyt se han propuesto dos hipótesis. El primer modelo sugiere que las toxinas activas se unen a la membrana celular e inducen la formación de canales selectivos a cationes lo cual provoca la muerte celular debido a la lisis osmótica (Promdonkoy y Ellar, 2003). Mientras que el segundo modelo propone la formación de agregados no específicos de las proteínas Cyt en la superficie de la membrana celular provocando un desajuste en la arquitectura de la misma y la muerte celular por un efecto detergente (Manceva *et al* , 2005).

Se ha demostrado que existe un mecanismo de acción sinérgico entre las proteínas Cyt y las proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis* *svar. israelensis*, sugiriendo que Cyt1Aa funciona como receptor de Cry11Aa y facilita su unión a la membrana citoplasmática de las células epiteliales donde ejerce su efecto tóxico. El cristal parasporal de este microorganismo está compuesto por las proteínas Cyt1Aa, Cyt2Ba, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cry11Aa (Pérez *et al.*, 2005).

II 5. Proteínas Vip. Características y modo de acción.

Las proteínas Vip, del inglés “Vegetative Insecticidal Proteins”, a diferencia de las proteínas Cry y Cyt, son producidas por Bt durante la fase de crecimiento vegetativo. Además se excretan al medio extracelular y no forman inclusiones cristalinas (Estruch *et al.*, 1996). Para la clasificación de las proteínas Vip se emplea el mismo sistema de nomenclatura que se utiliza para las proteínas Cry y Cyt aunque no presentan ningún grado de identidad con éstas, y hasta la fecha se han descrito 4 grupos de proteínas Vip: Vip1, Vip2, Vip3 y Vip4.

Las proteínas Vip1 y Vip2 actúan como una toxina binaria y tienen efecto tóxico sobre insectos de los órdenes Coleoptera y Hemiptera. Estudios de la distribución de los genes *vip1* y *vip2* en Bt han demostrado que estos están presentes aproximadamente en el 10 % de las cepas analizadas. Estos genes se encuentran localizados en megaplásmidos, en un mismo operón, con dos marcos abiertos de lectura diferentes separados por un región intergénica espaciadora (Chakroun *et al.*, 2016). Además de Bt y *B. cereus* se han encontrados genes *vip1* y *vip2* en otras bacterias con *Lysinibacillus sphaericus* y

Brevibacillus laterosporus (Ruiu, 2013). Las proteínas Vip 1 y Vip2 se expresan de manera concomitante y la traducción a partir de un mismo transcrito parece ser esencial para asegurar altos niveles de expresión en ambas proteínas.

Las proteínas Vip1 y Vip2 actúan según el modelo de las toxinas A+B que también presentan las toxinas de algunas bacterias del género *Clostridium*. En este modo binario sinérgico las proteínas no forman un agregado antes de unirse a la superficie celular. Al parecer Vip1 actúa como el componente B de la toxina binaria y su función es formar canales en la célula a través de los cuales pasará Vip 2, componente A, para ejercer el efecto tóxico (Barth *et al.*, 2004). Sin embargo el mecanismo molecular de acción de las proteínas Vip1 y Vip2 no está totalmente esclarecido. El proceso de varios pasos comienza con la ingestión de las toxinas por larvas susceptibles, seguido de una activación proteolítica por proteasas de tipo tripsina. Se ha observado que los monómeros activos de la proteína Vip1 pueden formar oligómeros que reconocen receptores específicos en la membrana de las células del epitelio intestinal (Leuber, 2006). El mecanismo de entrada de Vip2 a la célula todavía no se conoce, pero teniendo en cuenta la semejanza de esta proteína con el componente C2-I de la toxina binaria de *Clostridium* spp. parece ser que Vip2 entra a la célula por endocitosis (Barth *et al.*, 2004).

Al igual que las proteínas Vip1 y Vip2, las proteínas Vip3 están codificadas en genes que se encuentran en megaplásmidos (Mesrati *et al.*, 2005), aunque algunos autores sugieren que los genes *vip3* pueden estar presentes también en el cromosoma bacteriano (Franco-Rivera *et al.*, 2004). Las proteínas Vip3 tienen un tamaño aproximado de 89 kDa, la región amino terminal de las mismas es muy conservada lo cual sugiere que puede tener un papel importante en la estructura y/o la toxicidad de la proteína. La región carboxilo terminal es más variable y se cree que puede estar relacionada con la especificada de la toxina (Wu *et al.*, 2007). Además se ha visto que estas proteínas tienen motivos de unión a carbohidratos (Marchler-Bauer *et al.*, 2011). La estructura tridimensional de las proteínas Vip3 no ha sido elucidada. La predicción de la estructura secundaria sugiere que la región amino está compuesta principalmente por α -hélices mientras que en la región carboxilo terminal abundan las β -hélices (Rang *et al.*, 2005).

La mayoría de la información sobre la actividad insecticida de las proteínas Vip3 se ha obtenido a partir de los estudios realizados con las variantes más abundantes de la subfamilia Vip3Aa, ya que hay muy pocos reportes sobre la toxicidad de las proteínas Vip3B y Vip3C. Las proteínas Vip3A son tóxicas a un amplio número de especies de lepidópteros y vale la pena mencionar que son activas hacia insectos de los géneros *Spodoptera* y *Agrotis* (Hamadou-Charfia, *et al.*, 2013), los cuales son muy tolerantes a las proteínas Cry.

Las proteínas Vip3A pueden actuar de forma sinérgica con las proteínas Cry, se ha observado que al silenciar el gen *vip3A* en la cepa *B. thuringiensis* HD-1, esta disminuye drásticamente su toxicidad hacia *Agrotis ipsilon* y *Spodoptera exigua* (Donovan *et al.*, 2001). Este sinergismo también se ha observado con Vip3A y Cyt2 contra el lepidóptero *Chilo suppressalis* y *Spodoptera exigua* mediante la expresión conjunta de las proteínas en la bacteria *Escheria coli* (Yu *et al.*, 2012). Igualmente se ha encontrado antagonismo entre Vip3A y Cry1Ia en *Spodoptera eridiana*, así como en combinación con Cry1A y Cry1Ca en *Heliotis virescens* y *Spodoptera frugiperda* (Lemes *et al.*, 2014). El mecanismo relacionado con los efectos sinérgicos de Vip3 y otras proteínas no se conoce del todo.

Teniendo en cuenta la falta de homología entre las proteínas Cry y las proteínas Vip3 se ha sugerido que el mecanismo de acción de estas toxinas debe ser distinto. Sin embargo algunos autores plantean que a pesar de las diferencias, el mecanismo de acción de las proteínas Vip3 posee la misma secuencia de pasos que el de las proteínas Cry que implica: activación por proteasas del intestino de los insectos susceptibles, unión a receptores específicos de la membrana del epitelio intestinal y formación de poros. Los síntomas que se observan en los insectos luego de la ingesta de proteínas Vip3 se asemeja a los que se observan durante una intoxicación con proteínas Cry: cese de la ingesta, pérdida de movimientos peristálticos intestinales y parálisis general del insecto (Lee *et al.*, 2003).

Recientemente se identificó la proteína Vip4Aa1. El gene que codifica para esta tiene una longitud de 2895 pb y la secuencia de aminoácidos deducida posee 965 residuos con un tamaño molecular aproximado de 108 kDa. Las propiedades insecticidas de Vip4 todavía no se conocen (Chakroun *et al.*, 2016).

II 6. Thuringiensina

La exotoxina thuringiensina fue descubierta por McConnell y Richards (1959) quienes la describieron como una sustancia termoestable y tóxica hacia algunos insectos, pero principalmente hacia la mosca doméstica (*Musca domestica*). Posteriormente Heimpel (1967) propuso el nombre de β -exotoxina pero este término se ha considerado inapropiado debido a la estructura de este compuesto. La fórmula química de la thuringiensina es $C_{22}H_{32}N_5O_{19}P$ (De Rijk *et al.*, 2013) e inicialmente se consideró que estaba compuesta por adenosina, glucosa, un ácido fosfórico y un diácido glucónico (Farkas *et al.*, 1969). Posteriormente se sugirió que estaba compuesta por adenina, ácido alérico fosforilado y una molécula de azúcar formada por D-ribosa y D-glucosa unidas por un enlace éter inusual (Sebesta & Horska, 1970). Actualmente se conoce que la thuringiensina está constituida por polímeros de monosacáridos con átomos de carbono asimétricos (Liu *et al.*, 2010).

Muchas cepas de Bt producen thuringiensina (Jing-Wen *et al.*, 2007), así como algunas cepas de *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. cereus* (Perchat *et al.*, 2005). En 1990 se descubrieron dos tipos de thuringiensinas mediante ensayos de cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC) (Levinson *et al.*, 1990). La thuringiensina de tipo I tiene bajo peso molecular, aproximadamente 701 Da (Mac Inness & Bouwer, 2009) y es tóxica a casi todos los organismos debido a su mecanismo de acción. Esta molécula inhibe la biosíntesis de la RNA polimerasa, una de las enzimas más importantes en la transferencia de la información genética, proceso fundamental para todos los seres vivos (Harry, 2015)

La producción de thuringiensina I está soportada por plásmidos y recientemente se descubrió que el gen *thu3*, que es un homólogo del transportador ABC, está involucrado en la secreción de esta molécula (Espinasse *et al.*, 2002a). Los genes *thuC* y *thuD* codifican proteínas responsables de la síntesis del principal precursor de la thuringiensina I, el diácido glucónico. Los genes *thuF* y *thuI* están relacionados con el ensamblaje de la toxina, mientras que el gen *thuE* codifica la enzima responsable de la fosforilación de la toxina (Liu *et al.*, 2014). Se plantea que la producción de thuringiensina I está relacionada con la presencia de los plásmidos que contienen los genes *cry* y *vip1/vip2*. Sin embargo algunas cepas acristalíferas también pueden producir thuringiensina I (Espinasse *et al.*, 2002b).

La thuringiensina II se ha detectado en *B. thuringiensis* svar *morrisoni*, es un análogo del uracil trifosfato (UTP) y presenta mayor toxicidad que la thuringiensina I, principalmente hacia insectos del orden Coleoptera. Debido a los pocos estudios que existen sobre esta molécula, todavía no se conoce su estructura (Hernández *et al.*, 2003).

Debido a su amplio espectro y su poca especificidad hacia insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Isoptora entre otros, se considera que la thuringiensina puede ser una excelente opción para el control biológico (Obeidat *et al.*, 2012). Cuando se administra oralmente en dosis subletales esta toxina puede tener efectos teratogénicos y además puede afectar pasos críticos en la metamorfosis de los insectos como: la ecdisis, la transformación en pupa y la emergencia de los adultos. En algunos casos la fertilidad también se puede ver afectada.

Desde que en 1969 se declaró que la thuringiensina era letal para las ratas, el uso comercial de las cepas de Bt productoras de esta sustancia comenzó a ser cuestionado, limitando de esta manera su aplicación como agentes de control biológico. En 1999 la Organización Mundial de la Salud (WHO) recomendó eliminar de las formulaciones de bioinsecticidas las cepas productoras de thuringiensina. Es por esto que actualmente en países como Estados Unidos y México la producción de thuringiensina es un factor limitante en la búsqueda de nuevas cepas de Bt con potencial para el control biológico de insectos.

II 7. Otros factores de virulencia de *Bacillus thuringiensis*

Bt ha desarrollado un amplio arsenal de compuestos tóxicos, algunos específicos contra insectos como las δ -endotoxinas, pero también otros menos selectivos que contribuyen de alguna manera a su efecto tóxico. La presencia de estos factores de virulencia es dependiente de la cepa y debe considerarse en la producción de cualquier producto basado en Bt. A continuación se describen algunos de estos factores.

Bt es capaz de inhibir el sistema de defensa humoral de las larvas mediante la producción de una metaloproteasa denominada InhA que degrada los péptidos

antimicrobianos producidos por el insecto, particularmente las atacinas y cecropinas. Se sugiere que este tipo de proteasas tiene un papel fundamental en la invasión del hemocele de los insectos por Bt (Fedhila *et al.*, 2002). La proteína madura contiene 650 aminoácidos con un peso molecular de 71.2 kDa y su secuencia de aminoácidos posee sitios de unión a zinc y estructuralmente es muy parecida a las metaloproteasas PrtV y la termolisina de *Vibrio cholerae* y *Bacillus thermoproteolyticus* respectivamente. Actualmente se conoce que InhA no es esencial para el crecimiento y la esporulación de Bt sin embargo su expresión es necesaria pero no suficiente para la virulencia de Bt (Fedhila *et al.*, 2003). El mecanismo de acción de esta proteasa no se conoce con exactitud, se ha observado que actúa en el intestino de larvas de lepidópteros y causa lisis de las células epiteliales. Este efecto es muy similar al descrito para las proteínas Cry y Vip. Además se ha demostrado que puede existir sinergismo entre InhA y las proteínas Cry (Dammak *et al.*, 2015).

Otra metaloproteasa considerada recientemente como un nuevo factor de virulencia de Bt es la proteína Bmp1 que posee actividad nematocida hacia *Caenorhabditis elegans*. Bmp1 posee similitud con otras metaloproteasas conocidas ya que presenta tolerancia a altas temperaturas y valores de pH. Se ha observado de que Bmp1 tiene un efecto sinérgico con la proteína Cry5Ba en su actividad nematocida destruyendo el intestino, sin embargo el efecto que Bmp1 causa sobre este órgano de las larvas susceptibles difiere del causado por la proteína Cry5Ba. Se cree que Bmp1 aumenta la osmolaridad del intestino y finalmente acelera la entrada de Cry5Ba hacia la cavidad entérica para ejercer su toxicidad (Luo *et al.*, 2013).

Bt produce además otra proteasa denominada Bel que actúa de manera sinérgica con la proteína Cry1Ac aumentando la toxicidad de esta última hacia *Helicoverpa armigera*. La proteína Bel actúa de un modo similar a las proteínas enhancinas de los baculovirus que degradan la membrana peritrófica del intestino medio en las larvas de los insectos susceptibles. Se demostró que la proteína Bel actúa de forma sinérgica con Cry1Ac aumentando la toxicidad de esta última hacia algunos lepidópteros (Fang *et al.*, 2009).

Las enzimas quitinolíticas constituyen una familia de proteasas que hidrolisan el enlace β -1-4 glicosídico de la quitina para formar monómeros de N-acetilglucosamina y

son producidas por muchos organismos (Barboza-Corona *et al.*, 1999). Las quitinasas producidas por Bt han sido centro de atención de algunos investigadores en los últimos años. La quitina es el principal componente del exoesqueleto y también está presente en la membrana peritrófica que recubre el epitelio intestinal del insecto, por tanto sería razonable pensar que las enzimas quitinolíticas producidas por Bt pueden aumentar su efecto tóxico provocando daños en la membrana peritrófica que facilitarían la unión de las proteínas Cry con sus receptores. Se ha demostrado que la mezcla de enzimas quitinolíticas con esporas y cristales de Bt tiene una mayor actividad insecticida (Wiwat *et al.*, 2000).

En 2006 se descubrió un grupo de proteínas insecticidas a las que se nombraron Sip1A de las siglas en inglés “Secreted Insecticidal Proteins”. Estas proteínas poseen efecto tóxico hacia coleópteros y su espectro de toxicidad es muy parecido al de las proteínas Cry3A y Cry3Bb. Los genes que codifican las proteínas Sip1A están presentes en megaplásmidos al igual que las proteínas Cry y específicamente se cree que pueden estar presentes en el plásmido que contine los genes *cry3A*. Las proteínas Sip tienen un pequeño porcentaje de similitud con las proteínas Mtx de *Bacillus sphaericus* (Donovan *et al.*, 2006).

II 8. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis*.

A partir del descubrimiento de Bt se comenzaron a reportar nuevas cepas en todo el mundo, por lo que fue necesario diseñar una forma apropiada para diferenciarlas y caracterizarlas. En 1962 se propuso un método que se utiliza hasta la actualidad para la clasificación de las distintas cepas de Bt en función de la aglutinación del antígeno del flagelo bacteriano (antígeno H) (de Barjac y Bonnefoi, 1962). Para realizar esta metodología se utilizan antisueros de referencia y se analiza la aglutinación de las cepas no caracterizadas. Si la cepa no reacciona con ninguno de los antisueros conocidos, se considera un posible nuevo serotipo. Posteriormente se obtiene un antisuero para esta cepa, se compara con todos los serotipos para probar si existe reacción cruzada, de ser negativo se considera un nuevo serotipo. Hasta la fecha se han logrado discriminar un total de 71 serotipos o serovariedades de Bt (Tabla 1) (Lecadet *et al.*, 1999; Roh *et al.*, 2009).

En la actualidad, la serotipificación se considera un método eficiente y adecuado en la caracterización de cepas de Bt; sin embargo, una de sus deficiencias es que existen cepas autoaglutinables o bien sin flagelos las cuales no pueden ser clasificadas. Debido a las limitaciones de esta metodología se han desarrollado técnicas de biología molecular para la caracterización de cepas de Bt, lo cual también permite determinar la relación filogenética entre las cepas. Una de estas se basa en el análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas que conforman el flagelo lo cual permite diferenciar cepas de Bt de igual forma que la serotipificación y caracterizar cepas autoaglutinables y cepas sin flagelos (Xu y Côté, 2008).

Por otro lado el cromosoma bacteriano contiene múltiples secuencias repetidas que ocupan regiones intergénicas en sitios dispersos por todo el genoma. Estos bloques de secuencias repetidas no codificantes pueden generar un patrón de bandas único para cada cepa bacteriana. Esto permite el uso de la técnica del Rep-PCR para la caracterización de diferentes especies bacterianas (Versalovic *et al.*, 1998). Este método molecular ha sido utilizado en la identificación y clasificación de cepas de Bt. Su uso ha demostrado que la mayoría de las serovariedades posee un patrón de bandas específico y se han podido caracterizar cepas autoaglutinantes y cepas no móviles, además es un método eficiente, rápido, reproducible y específico (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2005).

Adicionalmente Bt consta de un cromosoma que varía entre 4.3 y 5.7 Mb y posee además una gran variedad de elementos extracromosómicos, los cuales pueden ser de dos tipos: los plásmidos pequeños de menos de 10 MDa, cuya función en la célula se desconoce y los megaplásmidos, en donde se localizan los genes cry.

Tabla 1. Serovariedades de *Bacillus thuringiensis* conocidas hasta la fecha.

Antígeno H	Serovar	Antígeno H	Serovar
1	<i>Thuringiensis</i>	30	<i>Medellin</i>
2	<i>Finitimus</i>	31	<i>Toguchini</i>
3a, 3c	<i>Alesti</i>	32	<i>Cameroun</i>
3a,3b, 3c	<i>khurstaki</i>	33	<i>Leesis</i>
3a, 3b, 3d	<i>Mogi</i>	34	<i>Konkukian</i>
3a, 3d	<i>Sumiyoshiensis</i>	35	<i>Seoulensis</i>
3a, 3d, 3e	<i>Fukoakaensis</i>	36	<i>Malayensis</i>
4a, 4b	<i>Sotto</i>	37	<i>Andaluciensis</i>
4a, 4c	<i>Kenyae</i>	38	<i>Oswaldocruzi</i>
5a, 5b	<i>Galleriae</i>	39	<i>Brasiliensis</i>
5a, 5c	<i>Canadienses</i>	40	<i>Huashongensis</i>
6	<i>Entomocidus</i>	41	<i>Soocheon</i>
7	<i>Aizawai</i>	42	<i>Jinghongiensis</i>
8a, 8b	<i>Morrisoni</i>	43	<i>Guiyangiensis</i>
8a, 8c	<i>Ostrinae</i>	44	<i>Higo</i>
8b, 8d	<i>Nigeriensis</i>	45	<i>Roskildiensis</i>
9	<i>Tolworthi</i>	46	<i>Chanpaisis</i>
10a, 10b	<i>Ddarmastatiensis</i>	47	<i>Wratislaviensis</i>
10a, 10c	<i>Londrina</i>	48	<i>Bakearica</i>
11a, 11b	<i>Toumanoffi</i>	49	<i>Muju</i>
11a, 11c	<i>Kyushuensis</i>	50	<i>Navarriensis</i>
12	<i>Thopmsoni</i>	51	<i>Xiaguangiensis</i>
13	<i>Pakistaní</i>	52	<i>Kim</i>
14	<i>Israelensis</i>	53	<i>Asturiensis</i>
15	<i>Dakota</i>	54	<i>Poloniensis</i>
16	<i>Indiana</i>	55	<i>Palmanyoliensis</i>
17	<i>Tohokuensis</i>	56	<i>Rongseni</i>
18a, 18b	<i>Kumamotoensis</i>	57	<i>Pirenaica</i>
18a, 18c	<i>Yosso</i>	58	<i>Argentiniensis</i>
19	<i>Tochigiensis</i>	59	<i>Ibérica</i>
20a, 20b	<i>Yunnanensis</i>	60	<i>Pingluonsis</i>
20a, 20c	<i>Pondicheriensis</i>	61	<i>Sylvestriensis</i>
21	<i>Colmeri</i>	62	<i>Zhaodongiensis</i>
22	<i>Shadongiensis</i>	63	<i>Bolivia</i>
23	<i>Japonensis</i>	64	<i>Azorensis</i>
24a, 24b	<i>Neoleonensis</i>	65	<i>Pulsiensis</i>
24a, 24c	<i>Novosivirsk</i>	66	<i>Graciosensis</i>
25	<i>Coreanensis</i>	67	<i>Vazensis</i>
26	<i>Silo</i>	68	<i>Thailandensis</i>
27	<i>Mexicanensis</i>	69	<i>Pahangli</i>
28a, 28b	<i>Monterrey</i>	70	<i>Sinensis</i>
28a, 28c	<i>Jegathesan</i>	71	<i>Jordanica</i>
29	<i>Amagiensis</i>		

El arreglo de plásmidos puede ser diferente entre las cepas y los pesos moleculares oscilan entre 1.4 y 180 MDa, con un número de 2 a 17 plásmidos por célula y presenta un patrón único en su arreglo por lo que el número y tamaño de las bandas plasmídicas es una herramienta útil en la caracterización de cepas. El análisis de plásmidos menores de 30 MDa permite diferenciar cepas de Bt de forma compatible con la serotipificación, además permite inferir posibles relaciones filogenéticas debido a la presencia de un mismo patrón básico para cada serotipo (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2008).

El MLST del inglés “Multilocus Sequence Typing” es una poderosa herramienta en la determinación de relaciones genéticas y se emplea en taxonomía bacteriana. Es un método de caracterización de aislados microbianos por medio de la secuenciación de fragmentos internos de genes esenciales para el metabolismo (“house keeping genes”) y se diseñó inicialmente para estudios epidemiológicos. Esta técnica tiene la ventaja de que los datos obtenidos se pueden compartir a través de Internet sin necesidad de intercambiar cultivos vivos. Para realizar el MLST, fragmentos de aproximadamente 500 pb de longitud de 6 o 7 genes son secuenciados, a cada secuencia se le asigna un marcador alélico y cada combinación alélica o perfil alélico se le asigna un número de secuencia tipo (Jolley *et al.*, 2004). Actualmente existen bases de datos de combinaciones alélicas de bacterias y hongos para el análisis y comparación de microorganismos que son muy útiles, lo cual se ha demostrado para el estudio las bacterias del grupo *cereus* (Soufiane y Baizet, 2013).

La secuencia de los genes del RNAr, especialmente la secuencia de la subunidad 16 S del RNAr representa el blanco de estudio más importante en la evolución y la ecología bacteriana, incluyendo la determinación de relaciones filogenéticas y la exploración de la diversidad bacteriana en diversos ambientes (Větrovský y Baldrian, 2013). En el grupo *cereus* de *Bacillus* se ha encontrado que esta secuencia presenta un alto porcentaje de similitud. Una variante de este método de caracterización es la ribotipificación. Esta es una técnica que se basa en el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de secuencias genómicas codificantes de rDNA. Permite obtener un patrón de bandas útil para identificar y tipificar cepas de microorganismos. Esta metodología también se ha empleado para realizar análisis filogenéticos entre serotipos de Bt (Joung y Côté, 2001). El gen que codifica para la subunidad mayor del RNA 23S rRNA

posee un mayor tamaño que el 16S rRNA y además se ha detectado que existe una mayor variabilidad entre diferentes especies bacterianas, esto hace que pueda ser una mejor opción teniendo en cuenta el gran porcentaje de homología que presentan los miembros del grupo *cereus* en el gen 16S rRNA (Bavikyn *et al.*, 2004).

También, el gen *gyrB* codifica para la subunidad II de la enzima DNA girasa, conocida también como topoisomerasa II. Esta enzima regula el enrollamiento de las cadenas de DNA y se encuentra presente en todas las especies bacterianas por lo que se ha propuesto también como marcador molecular para la clasificación y caracterización de bacterias y también se ha utilizado para establecer diferencias entre serotipos de Bt (Soufiane y Côté, 2009). Este método es muy rápido y reproducible teniendo en cuenta que se requiere solo una reacción de PCR, la posterior secuenciación y análisis filogenético de las secuencias. Se propone emplear este método en vez de la hibridación DNA: DNA que es mucho más caro (La Duc *et al.*, 2004). Una variante de este método incluye la digestión posterior de los productos de PCR con la endonucleasa *Sau3AI*, lo cual no sólo permite establecer diferencias entre *B. cereus* y Bt sino entre cepas de este último microorganismo sin necesidad de secuenciación y acortando el tiempo obtención de los resultados finales (Awad *et al.*, 2007).

Uno de los aspectos más importantes en la caracterización de cepas de Bt es la identificación de los genes *cry* que estas poseen ya que permite el descubrimiento de nuevas proteínas Cry y además puede establecer un posible rango de toxicidad aún sin realizar bioensayos, teniendo en cuenta de que algunos grupos de proteínas Cry sólo presentan toxicidad hacia ciertos órdenes de insectos. Inicialmente para la detección e identificación de genes *cry* se empleaban iniciadores generales para amplificar algunos genes en particular. Esta metodología consumía demasiado tiempo ya que se debía realizar un PCR por cada gen *cry* que se deseaba amplificar, además presentaba limitaciones ya que algunos genes *cry* no podían ser detectados. Posteriormente se diseñó un sistema de tres grupos de iniciadores basados en secuencias conservadas entre todas las proteínas Cry de tres dominios que permitía amplificar varios genes *cry* en una única reacción de PCR. Este método es potencialmente capaz de amplificar todos los genes *cry* de las proteínas Cry de

tres dominios que se conocen hasta la fecha y mediante su uso se han podido identificar nuevos holotipos de proteínas Cry (Noguera e Ibarra, 2010).

II 9. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es una poderosa herramienta de biología molecular que se ha utilizado por más de tres décadas para alterar la secuencia de nucleótidos del DNA. Se ha empleado en estudios de caracterización de genes, relaciones de estructura función en proteínas, interacciones proteína-proteína, unión de proteínas a dominios específicos y el estudio de sitios activos de algunas enzimas (Carrigan *et al.*, 2011). En este tipo de manipulación del DNA se altera la secuencia de nucleótidos y se estudian los efectos de estas modificaciones en los genes y las proteínas que estos codifican. Se han diseñado varios protocolos de mutagénesis dirigida que utilizan DNA de simple y doble cadena como molde para obtener las modificaciones. Los métodos en los que se utiliza DNA de cadena simple son muy laboriosos y consumen mucho tiempo, mientras que aquellos en los que se emplea DNA de doble cadena se utilizan con mayor frecuencia y existen mayor número de kits comerciales en los que se emplean iniciadores de oligonucleótidos mutagénicos.

Los sistemas más utilizados con DNA de doble cadena son los procedimientos de mutagénesis dirigida mediante un PCR (Braman *et al.*, 1996). De manera general en este tipo de técnica el primer paso es la desnaturalización del DNA de doble cadena, posteriormente los iniciadores reconocen sitios de complementación en el DNA y comienza la extensión del mismo por la acción de una DNA polimerasa específica y de alta fidelidad. Como paso final el producto de PCR se somete a digestión con la enzima endonucleasa *DpnI* que degrada el DNA parental metilado (Landt *et al.*, 1990).

En el caso particular de Bt, la mutagénesis dirigida ha sido de gran utilidad para el estudio de las interacciones entre los diferentes receptores y las proteínas Cry, de manera tal que se han podido identificar en varios casos cuáles son los aminoácidos que participan directamente en estas interacciones con su receptor (Zúñiga-Navarrete *et al.*, 2015). Además se he explorado mediante diferentes sustituciones y deleciones el papel que juegan

algunos aminoácidos en las interacciones antes mencionadas, dando lugar a la generación de proteínas Cry mucho más tóxicas (Deist *et al.*, 2014).

El intercambio de dominios mediante ingeniería de proteínas ha permitido obtener diversas quimeras constituidas por diferentes dominios de varias proteínas Cry. Estas nuevas proteínas poseen dominios intercambiados que les permiten tener un espectro de toxicidad más amplio e incluso aumentar su toxicidad específica hacia insectos originalmente susceptibles (Abdullah *et al.*, 2003). Este método es uno de los más antiguos empleados en la ingeniería de proteínas con el objetivo de obtener toxinas con nuevas propiedades. Con frecuencia se utiliza en intercambio del Dominio III entre proteínas Cry ya que este está relacionado con la unión a receptores presentes en insectos específicos (de Maagd *et al.*, 1996; Naimov *et al.*, 2001).

Otra de las aplicaciones de la mutagénesis dirigida para el mejoramiento de las proteínas Cry ha sido la introducción de modificaciones para facilitar la activación proteolítica de las mismas. Como se mencionó anteriormente la activación de las proteínas Cry es mediada por la acción de proteasas alcalinas del intestino de los insectos. En algunos casos la resistencia de los insectos a las proteínas Cry se debe a un incompleto procesamiento proteolítico de la protoxina (Rajagopal *et al.*, 2009). Para corregir estos problemas se han insertado adecuadamente mediante mutagénesis dirigida, sitios de corte que pueden ser reconocidos por las proteasas intestinales del insecto lo cual ha resultado en una correcta activación de la protoxina (Walters *et al.*, 2008). De igual manera se han eliminado sitios de reconocimiento de enzimas proteolíticas que se encuentran en la región interna de la protoxina evitando la degradación y aumentando la toxicidad de la misma (Bah *et al.*, 2004).

Por otra parte la delección de segmentos de aminoácidos específicos en las proteínas Cry permite evadir algunos pasos necesarios para la activación de las mismas, de esta manera las proteínas mutadas interactúan con mayor facilidad con los receptores de la membrana del intestino medio de los insectos susceptibles (Soberón *et al.*, 2007). Además se ha logrado cambiar la especificidad de algunas proteínas Cry logrando que sean tóxicos a otros insectos que anteriormente no eran afectados por las mismas. En un ejemplo

particular se modificaron los lazos 1 y 2 del dominio II de la proteína Cry1Aa mimetizando los lazos 1 y 2 del mismo Dominio de la proteína Cry4Ba. Como consecuencia la proteína Cry1Aa modificada perdió su toxicidad hacia *Manduca sexta* y ganó toxicidad hacia *Culex pipiens* (Liu y Dean, 2006).

II 10. Aplicaciones biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* y las proteínas Cry

Programas intensivos de búsqueda en diferentes laboratorios a nivel mundial han permitido el aislamiento y la caracterización de nuevas cepas de Bt portadoras de nuevos genes *cry* con diferentes potencialidades. Sin embargo este tipo de análisis implica el estudio de cientos de cepas de manera individual, lo cual consume mucho tiempo y en ocasiones del total de cepas estudiadas sólo se encuentran unas pocas que realmente poseen una alta toxicidad y que constituyen posibles candidatos para la formulación de nuevos productos convencionales de Bt.

Existen en el mercado cientos de formulaciones de Bt que contienen esporas y cristales. Las presentaciones de estos productos son generalmente en forma de sólidos (polvos o gránulos) y líquidos que se aplican por aspersión. En el sector agrícola, los productos de Bt se aplican principalmente para el control de lepidópteros en cultivos como: maíz, sorgo, soya, algodón y tabaco (Rosas-García, 2008).

Luego del descubrimiento de que los plásmidos de Bt se pueden transferir a otras cepas mediante conjugación se abrieron nuevas puertas para el desarrollo de nuevas cepas productoras de varias proteínas Cry seleccionadas para el control de una plaga en particular o bien la combinación de genes para generar cepas tóxicas tanto a lepidópteros como a coleópteros (Kalman *et al.*, 1995). También se ha probado la introducción mediante conjugación de genes *cry* en bacterias que persisten en la filósfera de algunas plantas. Estas bacterias modificadas no son estrictamente transgénicas (Bora *et al.*, 1994).

Otra estrategia para mejorar la explotación de las proteínas Cry y aumentar su potencial entomopatógeno involucra la diversificación o mejora de la manera en que estas proteínas son liberadas. Varios sistemas de liberación se han desarrollado con el objetivo de

aumentar la persistencia de las proteínas Cry en el campo. El primero de estos permite la producción de proteínas Cry por otras bacterias no patógenas que son inactivadas mediante procesos químicos y físicos al finalizar el proceso de fermentación, mientras las toxinas quedan encapsuladas en la célula que las protege de la degradación por los rayos UV (Stock *et al.*, 1990). Para combatir insectos del suelo que se alimentan de raíces e insectos chupadores se implementaron estrategias semejantes expresando genes *cry* en bacterias colonizadoras de la rizósfera (Selinger *et al.*, 1998) y bacterias endosimbióticas de las plantas (Subashini *et al.*, 2011). También se han expresado proteínas Cry con actividad mosquitocida en bacterias acuáticas que habitan en la zona de alimentación de algunos mosquitos (Guevara *et al.*, 2004).

Aunque inicialmente se utilizó la conjugación para manipular cepas de Bt posteriormente se emplearon procedimientos de transformación que representaron nuevas posibilidades para mejorar el potencial entomopatógeno de Bt creando variantes modificadas de algunas cepas con una mayor actividad insecticida. La primera cepa de Bt recombinante que se produjo contenía genes *cry* con actividad hacia coleópteros y lepidópteros ampliando de esta manera su rango de toxicidad (Lecadet *et al.*, 1992). Se construyeron además cepas recombinantes que producían melanina en conjunto con las proteínas Cry para proteger a estas de las radiaciones ultravioletas, porque a pesar de aumentar la toxicidad y el rango de acción de las proteínas Cry, todavía los factores medioambientales continúan siendo un aspecto limitante en la persistencia de las toxinas de Bt en las hojas de las plantas.

Mediante ingeniería genética se han obtenido varias especies de plantas con genes *cry* o *vip* de Bt, lo cual les confiere resistencia a las plagas. Entre los cultivos más importantes que se han transformado se encuentran el algodón, el maíz, el arroz y la soya. Comúnmente se hace referencia a este tipo de plantas como “plantas o cultivos Bt”. Los principales países que han adoptado este tipo de cultivos son Estados Unidos, Argentina, Brasil, China e India lo cual ha permitido disminuir considerablemente el uso de insecticidas químicos (Romeis *et al.*, 2006).

III JUSTIFICACIÓN

Las proteínas Cry son consideradas los principales factores de virulencia de *B. thuringiensis* sin embargo a pesar del gran número de proteínas Cry reportadas hasta la fecha sólo una pequeña parte de estas poseen actividad insecticida y una porción aún más pequeña contiene proteínas altamente tóxicas. Es por ello que la búsqueda de nuevas cepas nativas de *B. thuringiensis* se ha intensificado, con el objetivo de encontrar nuevas cepas con mayor toxicidad y/o mayor espectro de actividad que además puedan ser portadoras de nuevos genes *cry*. El estudio y la caracterización de la cepa LBIT-1200 permitirán demostrar que es una cepa nativa y original, y que puede ser empleada para el control biológico de insectos que afectan la producción agrícola. Además, la identificación de genes *cry* y el análisis de otros factores de virulencia aportarán información valiosa para comprender mejor la toxicidad de la misma hacia lepidópteros.

IV Hipótesis

La caracterización de la cepa *Bacillus thuringiensis* LBIT-1200 permitirá determinar que es una cepa original y con alto potencial para su desarrollo como bioinsecticida, y permitirá identificar nuevos factores de virulencia que pudieran contribuir a una mayor toxicidad.

V OBJETIVOS

V1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la cepa *Bacillus thuringiensis* LBIT 1200 e identificar los factores de virulencia relacionados con su toxicidad.

V2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el espectro de toxicidad de la cepa *B. thuringiensis* LBIT-1200 en insectos de diferentes órdenes (Coleóptera, Díptera y Lepidóptera) y nemátodos.
2. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de la cepa *B. thuringiensis* LBIT-1200 en insectos susceptibles.
3. Caracterizar la cepa *B. thuringiensis* LBIT-1200 desde el punto de vista molecular, bioquímico y serológico.
4. Identificar los genes *cry* presentes en la cepa *B. thuringiensis* LBIT-1200.
5. Identificar los genes *vip* presentes en la cepa *B. thuringiensis* LBIT-1200.
6. Evaluar el efecto tóxico de las proteínas Vip en insectos susceptibles.
7. Identificar los factores que incrementan la toxicidad de la cepa LBIT-1200.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI 1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) utilizadas se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Bioinsecticidas de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Para los diferentes estudios que se realizaron se emplearon las cepas estándar: HD-1, HD-73 y NRD-12 (serovar *kurstaki*), ISP-82 (serovar *israelensis*), LBIT-441 (cepa *tenebrionis*), LBIT-682 (serovar *xiaguangiensis*) y la cepa de estudio LBIT-1200. Las cepas se sembraron en agar para métodos estándar (Difco) a 28 °C y en medio líquido LB (Luria-Bertani) para la extracción de DNA. Las transformaciones se hicieron en *Escherichia coli* Top10 y DH5 α (Invitrogen) usando medio de LB más carbenicilina (100 μ g/ml) con incubación a 37 °C y la cepa acristalífera de Bt LBIT-601 del serotipo *kurstaki* en medio LB más eritromicina (50 μ g/ml). Para los bioensayos las cepas de Bt se sembraron en medio líquido BHI (Infusión Cerebro Corazón) hasta la autólisis del cultivo (240 rpm, 28° C), posteriormente se centrifugaron para desechar el sobrenadante y se lavaron tres veces con agua destilada estéril, el pellet se congeló a -20⁰ C y posteriormente se liofilizó (Labconco). El complejo espora cristal liofilizado de cada cepa se guardó a 4⁰ C hasta su uso.

VI 2. Evaluación de la toxicidad *Bacillus thuringiensis* LBIT-1200 mediante bioensayos preliminares

Para evaluar el rango de toxicidad de la cepa *B. thuringiensis* LBIT-1200 se realizaron bioensayos burdos empleando altas concentraciones del complejo espora-cristal de la bacteria mediante procedimientos establecidos en el Laboratorio de Bioinsecticidas, CINVESTAV-Irapuato. Se analizó la toxicidad de la cepa LBIT-1200 frente a larvas de *Manduca sexta* (Lepidoptera), *Trichoplusia ni* (Lepidoptera), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Aedes aegypti* (Diptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera), *Leptinotarsa texana* (Coleoptera) y el nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

Con el fin de corroborar la toxicidad de las cepa LBIT-1200, se realizaron bioensayos burdos utilizando una mezcla del complejo espora-cristal. Para los bioensayos semifinos contra *M. sexta*, *T. ni*, y *S. frugiperda*, el complejo espora-cristal se diluyó en una solución de Tween 80 al 0.02 % hasta quedar a una concentración de 10 mg/ ml. Posteriormente se añadieron de forma homogénea 200 µl de la suspensión sobre la superficie de cajas Petri con dieta artificial para cada uno de los insectos. Se colocaron en cada caja Petri 20 larvas de primer instar y como control positivo en todos los bioensayos se utilizó la cepa estándar de Bt HD-1. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento y se mantuvieron a una temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$ y un fotoperíodo de 14:10 luz: oscuridad (L:O). Las condiciones de humedad relativa (HR) cambiaron según la especie de lepidópteros. Para *M. sexta* la HR fue de 80% mientras que para *T. ni* y *S. frugiperda* la HR fue de 65-70 %. La mortalidad se determinó cinco días después en todos los casos.

Los bioensayos con *G. mellonella* se realizaron en placas de microtitulación de 24 pocillos. Se preparó agar con una solución de miel al 20 %, se cortaron unos pequeños bloques de 2 cm de largo y 0.8 cm de diámetro y se sumergieron en una suspensión del complejo espora cristal a una concentración de 10 mg/ml. Los bloques se secaron al aire por 20 minutos y se colocó un bloque en cada pocillo junto a una larva de *G. mellonella* de tercer instar. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento (en cada tratamiento se emplearon 20 larvas) y se utilizó la cepa de HD-1 como control positivo. Las placas de 24 pocillos se colocaron a una temperatura de 28°C , un fotoperíodo de 14:10 L:O y una HR de 65-70%. La mortalidad se determinó 5 días después.

En el caso de *A. aegypti*, se colocaron 20 larvas del cuarto instar en recipientes con 100 ml de agua corriente que contenían una asada del cultivo autolisado de la cepa LBIT-1200 en medio de agar para métodos estándar. Como control positivo se empleó en este bioensayo preliminar la cepa de Bt ISP-82 del serovar *israelensis*. La mortalidad se determinó a las 24h. Se realizaron tres réplicas por tratamiento. Los recipientes con los bioensayos se mantuvieron a una temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$.

Para los bioensayos con *L. texana* las larvas de tercer instar se mantuvieron en ayuno durante 24 horas y pasado este tiempo se pesaron y se anotó el peso de cada una de

ellas. Los bioensayos se realizaron en placas de microtitulación de 24 pozos. Se emplearon diez larvas por cada tratamiento y tres réplicas por cada uno. A las larvas en ayuno se les alimentó por vía oral con 2 µl de una solución de sacarosas al 20% que contenía una suspensión del complejo espora cristal liofilizado de la cepa LBIT-1200 a una concentración final de 10 mg/ml. Como control positivo se empleó la cepa LBIT-441. Las larvas tratadas se colocaron posteriormente en las pozos de las placas de titulación con dieta natural de trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) a una temperatura de 28 ± 2 °C con un fotoperíodo de 14:10 L:O y una HR del 80%. Las larvas se pesaron individualmente a las 24, 48 y 72 horas.

Para *T. molitor* se cortaron rodajas de zanahoria con un sacabocados número 9, se emplearon 10 rodajas por cada tratamiento y tres réplicas por cada uno. A cada rodaja se le adicionó 10 µl de una suspensión del complejo espora-cristal en Tween 80 al 0.02 % y se diseminó la suspensión en toda superficie de las rodajas de zanahoria. Posteriormente se dejaron secar 10 minutos al aire y se colocaron en placas de microtitulación de 24 pocillos y a cada pocillo se le adicionó una larva de *T. molitor*. Las placas de microtitulación se mantuvieron en oscuridad total a una temperatura de 28 ± 2 °C y una HR de 20-25 %. Como control positivo se utilizó la cepa LBIT-441 y la mortalidad se determinó 5 días después.

VI 3. Bioensayos con lepidópteros para determinar la concentración letal media (CL₅₀) empleando el complejo espora-cristal

Luego de realizar los bioensayos burdos para determinar la toxicidad de la cepa LBIT-1200 hacia insectos de diferentes órdenes se procedió a determinar la CL₅₀ (dosis a la que muere la mitad de la población de insectos empleados en el bioensayo) de LBIT-1200 frente a los insectos que fueron sensibles a esta cepa. Los bioensayos se realizaron con los lepidópteros *M. sexta*, *T. ni* y *S. frugiperda*. Las condiciones empleadas fueron las mismas que se describieron anteriormente, pero se usaron 6 dosis con concentraciones diferentes del complejo espora-cristal que fueron ajustadas para determinar las CL₅₀ y un mínimo de tres réplicas por cada dosis. Como control negativo se adicionó a las cajas Petri con dieta artificial una solución de Tween 80 al 0.02 %. En estos bioensayos también se incluyó la cepa estándar de Bt HD-73 para determinar la CL₅₀ de la misma contra estos insectos. Los

datos de mortalidad obtenidos en estos bioensayos que cumplieron con ciertos requisitos estadísticos, se procesaron mediante análisis estadístico PROBIT para estimar la CL_{50} y otros parámetros útiles para realizar comparaciones entre los valores de CL_{50} de las cepas de Bt analizadas.

VI 4. Bioensayos con lepidópteros para determinar la concentración letal media (CL_{50}) empleando cristales puros

Para obtener cristales puros, las cepas LBIT-1200 y HD-73 se cultivaron en medio de leche peptonizada hasta que se obtuvo la autólisis del cultivo (240 rpm, 28 °C). Las muestras se pasaron a frascos especiales para el rotor Sorvall GSA y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min. La pastilla obtenida fue lavada un mínimo de tres veces con agua destilada con el objetivo de eliminar los restos celulares. Los polvos de los complejos espora-cristal fueron obtenidos al congelar y liofilizar la pastilla. Para obtener los cristales purificados, la pastilla fue resuspendida en una solución de sacarosa al 10% y centrifugada a través de un gradiente discontinuo de sacarosa (57 a 82 %, peso/volumen). Las bandas obtenidas fueron colectadas y lavadas dos veces con agua destilada. Finalmente, los cristales se congelaron, liofilizaron y almacenaron para su uso posterior.

Los bioensayos se realizaron con los lepidópteros *M. sexta* y *T. ni*. Las condiciones empleadas fueron las mismas que se describieron anteriormente. Se emplearon 6 dosis con concentraciones diferentes de cristales puros que fueron ajustadas para determinar las CL_{50} y un valor mínimo de tres réplicas por cada dosis. Como control negativo se adicionó a las cajas Petri con dieta artificial una solución de Tween 80 al 0.02 %. En estos bioensayos también se incluyó la cepa estándar de Bt HD-73 para determinar la CL_{50} de los cristales puros de esta cepa contra estos insectos. Los datos de mortalidad obtenidos en estos bioensayos que cumplieron con los requisitos estadísticos, se procesaron mediante análisis estadístico PROBIT para estimar la CL_{50} .

VI 5. Determinación de la morfología de los cristales de la cepa LBIT-1200

Para determinar la morfología de los cristales producidos por la cepa LBIT-1200 se empleó una técnica de tinción negativa y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). La cepa se cultivó en medio Leche Peptonizada hasta que autólisis del cultivo. La esporulación fue monitoreada por microscopia de contraste de fases hasta la autólisis celular completa. El complejo espora-cristal se lavó tres veces consecutivas por centrifugación y agua destilada estéril, los pellets fueron resuspendidos en agua destilada. La concentración del complejo espora-cristal se ajustó hasta obtener una distribución de cristales apropiada, la cual fue observada bajo el microscopio de contraste de fases. Luego 2 μ l de cada suspensión se dispersó sobre rejillas de TEM cubiertas con Formvar y secada al aire. Enseguida se vertió 5 μ l de ácido fosfotúngstico al 1.5%, pH 6.8 sobre las muestras secas, luego de 2 minutos se secaron las muestras con papel de filtro y después se sumergieron en agua destilada estéril. Las rejillas fueron secadas al aire, examinadas y fotografiadas en un microscopio de electrónico de transmisión Phillips Morgani, operado con un voltaje de aceleración de 70 KV y 5600X de magnificación. De las fotografías de cada muestra, un total entre 15 y 25, los cristales se midieron individualmente a lo largo y se determinó el valor medio de las mediciones que correspondió al valor aproximado de la longitud de los cristales de la cepa LBIT-1200. Este valor se comparó con la longitud de los cristales de HD73 mediante análisis estadístico.

VI 6. Análisis del contenido proteico de los cristales de la cepa LBIT-1200

La cepa LBIT-1200 se cultivó en medio de Leche Peptonizada hasta autólisis, el pellet se lavó tres veces con agua destilada estéril y posteriormente se diluyó en agua destilada estéril, se midió la DO_{600} y se ajustó la concentración del complejo espora cristal a un valor de 4. Se tomaron alícuotas de 10 μ l y se mezclaron con 10 μ l de buffer 2X de Laemmli (Tris-HCl 0.25 M, SDS 2%, glicerol 40%, beta-mercaptoetanol 5%, Azul de bromofenol 0.001%) (Laemmli, 1970). Finalmente 10 μ l de las mezclas se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y la corrida electroforética se realizó a 80 V por 4h. Los geles fueron

teñidos en una mezcla de metanol al 40%, ácido acético al 7%, azul brillante de Coomassie 0.25%, durante 1h y desteñidos en una mezcla de metanol al 40% y Ac. Acético al 7% durante 1.5 horas. El marcador de peso molecular utilizado en la corrida electroforética fue el Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Invitrogen). Se emplearon como controles comparativos en este estudio las cepas estándar de Bt HD-1 y HD73.

VI 7. Serotipificación

Se realizó la técnica de serotipificación mediante microaglutinación en placas de titulación de 96 pozos (Laurent *et al.*, 1996). La cepa LBIT-1200 se cultivó en medio LB durante 12 horas, las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en solución salina (NaCl 0.85%). Se emplearon antisueros policlonales procedentes del Laboratorio de Bacterias Entomopatógenas del Instituto Pasteur (París, Francia). Los antisueros se diluyeron con solución salina y se colocaron en cada pocillo 10 μ l de antisuero diluido y 90 μ l de suspensión bacteriana ajustada a una concentración de $DO_{600}=1$. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C y posteriormente se observaron los resultados empleando un microscopio estereoscópico. Como controles se emplearon las cepas HD-1 (serotipo *kurstaki*), ISP-82 (serotipo *israelensis*), LBIT-441 (serotipo *tenebrionis*) y LBIT-682 (serotipo *xiaguangiensis*).

VI 8. Detección de β -exotoxinas

Para la detección de β -exotoxina se realizó un bioensayo cualitativo diseñado por Sánchez-Soto y colaboradores (2015) en el cual se emplea el nemátodo *C. elegans*. La cepa LBIT-1200 se cultivó en medio líquido de Leche Peptonizada hasta autólisis, el cultivo se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos, el pellet se desechó y el sobrenadante esterilizó en autoclave durante 20 minutos. Se emplearon 100 larvas de tercer instar del nematodo *C. elegans* en 500 μ L de agua destilada estéril que se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos, inmediatamente se añadieron además 500 μ L de sobrenadante estéril. Las placas se mantuvieron a 20 °C. La motilidad de los nemátodos se monitoreó cada 24 horas con un microscopio invertido de contraste de fases (Zeiss). Como control positivo se empleó en este estudio sobrenadante estéril de la cepa NRD-12 y como control negativo

agua destilada estéril. Se considera que un bioensayo es positivo cuando las larvas de *C. elegans* no presentaban motilidad al ser observadas en el microscopio.

VI 9. Extracción de DNA genómico

Se obtuvo un inóculo bacteriano de la cepa LBIT-1200 en 2 mL de medio LB con agitación a 200 rpm y 30° C durante 16 horas. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 300 mL de buffer J (Tris-HCl 1M, EDTA 0.1M, NaCl 0.15M, pH 8) que contiene además 40 mg/ml de lisozima y se incubó durante 45 minutos a 37° C. Posteriormente se le adicionó 20 µl de SDS al 10% y se homogenizó suavemente, luego se incubó 20 minutos a 70° C y se adicionaron 10 µl de las enzimas RNAsa (10 mg/mL) y Proteinasa K (10 mg/mL). Se incubó 1 hora y media a 60° C, se adicionó 50 µl de NaCl al 5M y se agitó suavemente en hielo por 15 minutos. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos, se recuperó el sobrenadante, se le adicionó 400 µl de isopropanol frío y se incubó a -70° C por 30 minutos. Como paso final del proceso de extracción de DNA genómico se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 200 µl de etanol al 70 %, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en agua destilada estéril y el DNA se conservó a una temperatura de -20° C para uso en posteriores experimentos.

VI 10. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la flagelina

Se amplificó el gen de la flagelina empleando los iniciadores y condiciones de PCR descritas por Xu y Côté (2008). Los iniciadores seleccionados están diseñados para amplificar la región central del gen de la flagelina, la cual codifica para los epítomos responsables de la reacción inmunológica que se utiliza en los métodos de serotificación de Bt. Los iniciadores empleados para el PCR fueron los siguientes: hagF 5'-agtacatgcgccaaaaccaag-3' y hagR 5'-gtttgcttgagaaagcatgct-3'. Se preparó una mezcla de reacción para el PCR que contenía 100 ng de cada iniciador, 100 ng de DNA genómico, 0.1 mM de MgSO₄, 0.8 mM de dNTPs, 1U de Platinum® *Taq* DNA Polimerasa High-Fidelity (Invitrogen) y un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 95° C, 30 ciclos que consistían

cada uno con un paso final de extensión de 7 min. a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido. Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron 2 µl que se cargaron en geles de agarosa al 1% y buffer 1X Tris-Acetato-EDTA (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y se corrieron durante 45 minutos a 90 V. Posteriormente se tiñeron con GelRed 1X (Biotium) y se fotografiaron en el sistema Gel Doc TM XR+ Gel Documentation system (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb Plus (Invitrogen). De los productos de PCR se tomaron 20 µl y se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen USA, la secuencia obtenida se introdujo en el programa informático MEGA 6.0, se tradujo la secuencia de nucleótidos a secuencia de aminoácidos y se realizó un análisis Blast https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch . Finalmente se realizó un alineamiento de esta secuencia de aminoácidos con otras depositadas en GenBank y que corresponden a diferentes serotipos de Bt para realizar un análisis filogenético (Tabla 2).

VI 11. Análisis de secuencias multilocus

Se realizó un análisis de las secuencias concatenadas de siete genes de tipo “house keeping” utilizando los iniciadores y condiciones de amplificación propuesto por Priest et al., 2004. Los genes analizados fueron : *glpF* (glycerol facilitator), *gmk* (guanylate kinase), *ilvD* (dihydroxy-acid dehydratase), *pta* (phosphate acetyltransferase), *pur* (, *pycA* (pyruvate carboxylase), *pycA* (pyruvate carboxylase ATP-binding subunit) y *tpi* (triosephosphate isomerase). Los iniciadores empleados para la amplificación de cada uno de los genes y las temperaturas de alineamiento de cada uno de ellos se muestra en la Tabla 3. Se preparó una mezcla de reacción para el PCR que contenía 100 ng de cada iniciador, 100 ng de DNA genómico, 0.1 mM de MgSO₄, 0.8 mM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA Polimerasa High-Fidelity (Invitrogen) y un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 94° C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 1 minuto a 94° C, alineamiento de 30 segundos a la temperatura adecuada para cada gen y extensión de 1 minuto a 72° C con un paso final de extensión de 7 minutos a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido.

Tabla 2. Número de acceso de GenBank de las secuencias de la flagelina de diferentes serotipos de *B. thuringiensis* usados en el análisis filogenético del serotipo de la cepa LBIT-1200

Serotipo	Número de acceso GenBank
<i>Alesti</i>	EF595771
<i>Alesti</i>	EF595772
<i>kurstaki</i>	EF595774
<i>kurstaki</i>	EF595775
<i>kurstaki</i>	EF595776
<i>sumiyoshiensis</i>	EF595777
<i>fukuokaensis</i>	EF595778
<i>Sotto</i>	EF595779
<i>kenyae</i>	DQ377249
<i>kenyae</i>	EF595782
<i>galleriae</i>	DQ377226
<i>galleriae</i>	EF595785
<i>canadensis</i>	DQ377227
<i>entomocidus</i>	DQ377250
<i>entomocidus</i>	EF595788
<i>morrisoni</i>	DQ377229
<i>morrisoni</i>	EF595789
<i>ostrinae</i>	DQ377251
<i>nigeriensis</i>	DQ377252
<i>darmstadiensis</i>	DQ377242
<i>londrina</i>	DQ377230
<i>toumanoffi</i>	DQ377254
<i>kyushuensis</i>	DQ377255
<i>kumamotoensis</i>	DQ377293
<i>Yosoo</i>	DQ377300
<i>yunnanensis</i>	DQ377260
<i>pondicheriensis</i>	DQ377261
<i>neoleonensis</i>	DQ377265
<i>novosibirsk</i>	EF595791
<i>monterrey</i>	DQ377233
<i>jegathesan</i>	DQ377234

Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron 2 µl que se cargaron en geles de agarosa al 1% y buffer 1X Tris-acetato-EDTA (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y se corrieron durante 45 minutos a 90 V. Posteriormente se tiñeron con GelRed 1X (Biotium) y se fotografiaron en el sistema Gel Doc TM XR+ Gel Documentation system (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb Plus (Invitrogen). De los productos de PCR se tomaron 20 µl y se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen USA. Una vez obtenida la secuencia de los genes se procedió al análisis de las mismas en la base de datos <http://pubmlst.org/bcereus/> con el objetivo de determinar el perfil alélico de la cepa LBIT-1200 y establecer semejanzas y diferencias con el resto de las cepas presentes en dicha base de datos.

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos y temperatura de alineamiento de los iniciadores empleados en el análisis de secuencias multilocus.

Gen	Iniciador directo 5'-3'	Iniciador reverso 5'-3'	Temp °C
<i>glpF</i>	gcg ttt gtg ctg gtg taa gt	ctg caa tgc gaa aga ag	59
<i>gmk</i>	att taa gtg agg aag ggt agg	gca atg ttc acc aac cac aa	56
<i>ilvD</i>	cgg ggc aaa cat taa gag aa	ggt tct ggt cgt ttc cat tc	58
<i>pta</i>	gca gag cgt tta gca aaa gaa	tgc aat gcg agt tgc ttc ta	56
<i>pur</i>	ctg ctg cga aaa atc aca aa	ctc acg att cgc tgc aat aa	56
<i>pycA</i>	gcg tta ggt gga aac gaa ag	ggc gtc caa gtt tat gga at	57
<i>tpi</i>	gcc cag tag cac tta gcg ac	ccg aaa ccg tca aga atg at	58

VI 12. Rep-PCR

Se realizó un Rep-PCR empleando los iniciadores y condiciones de amplificación descritas por Reyes-Ramírez e Ibarra (2005). Los iniciadores fueron diseñados para detectar regiones repetidas en el genoma de Bt y amplificar regiones colindantes. Las secuencias de nucleótidos de los iniciadores son las siguientes 5'- attaaagtttcactttat-3' (iniciador Bc-REP-1) y 5'- ttaatcagtgggg-3' (iniciador Bc-REP-2). Para las reacciones de PCR se utilizó un Termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400. Las mezclas de reacción para la obtención de productos Rep-PCR fueron las siguientes: DNA 100 ng, iniciadores 300 ng de cada uno, Mg⁺⁺ 5 mM, mezcla de dNTP 200 µM y Taq DNA polimerasa 2.5 U.I (Invitrogen) a un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación fueron

realizadas con un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95° C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 1 minuto a 94° C, alineamiento de 1 minuto a 42° C y extensión de 1.5 minutos a 72° C con un paso final de extensión de 7 minutos a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido. Para la visualización y análisis de los productos del Rep-PCR se utilizaron 10 µL de producto, los cuales fueron analizados en geles de agarosa al 1.2% (11 cm x 14 cm) en buffer 1X Tris-acetato-EDTA (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) a 2 V/cm, durante 5 h. Posteriormente fueron teñidos con GelRed 1X (Biotium). Los geles obtenidos fueron fotografiados en el sistema Gel Doc TM XR+ Gel Documentation system (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb Plus (Invitrogen). Se emplearon también en este análisis las cepas HD-1 y HD-73 como comparación.

VI 13. Análisis del perfil de plásmidos de bajo peso molecular

Para la extracción de plásmidos se empleó la metodología descrita por Reyes-Ramírez e Ibarra (2008). Para la extracción del DNA plasmídico se utilizaron 50 ml de un cultivo bacteriano fresco (8 a 12 hrs.) en medio Spizizen con una D.O.₆₀₀ de 0.9 a 1.1. Éste se centrifugó a 13000 rpm por 15 min. a 4 °C, la pastilla se resuspendió con 20 ml TES (30 mM Tris base, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl; pH 8.0) frío y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Las células obtenidas se resuspendieron en 2 ml de una solución de TES-sacarosa (sacarosa al 20% en TES) conteniendo 2 mg/ml de lisozima y 1 µl/ml de RNAsa (de una solución con una concentración de 10 mg/mL), se incubó a 37° C durante 90 min. y se monitoreó la formación de esferoplastos al microscopio óptico de contraste de fases. De ser necesario, se dejó incubar de 1 a 2 hrs. más. A la solución de esferoplastos se le adicionaron 3 ml de SDS al 8% en TES, y se incubó a 68° C durante 10 min. Luego se adicionaron 1.5 ml de solución de acetato de sodio 3M pH 4.8, se incubó 30 min. a -20° C, y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 20 min. a 4° C. Al sobrenadante se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó toda la noche a -20° C. El DNA se recuperó por centrifugación a 13000 rpm por 20 min. a 4° C, y la pastilla se resuspendió en 100 µl de TE pH 8 (Tris-HCl 10mM, EDTA 0.1 mM). Para visualizar los patrones de plásmidos se utilizaron 10 µl de suspensión de DNA plasmídico, los cuales

fueron visualizados en geles de agarosa horizontal (11 cm x 14 cm) al 0.6 % con 10 pozos, utilizando un amortiguador Tris-borato-EDTA (45 mM Tris-borato, 1mM EDTA) 1X. Los geles fueron sometidos a 2 V/cm, durante 16 horas. Posteriormente fueron teñidos de 10-15 min con GelRed 1X (Biotium). Los geles obtenidos fueron fotografiados en el sistema Gel DocTM XR+ Gel Documentation system (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. En cada gel se utilizó el marcador de peso molecular “Supercoiled” (Invitrogen) y la cepa *kurstaki* HD-73 como cepa de referencia.

VI 14. Detección e identificación de genes *vip*

Para detectar la presencia de genes *vip* en la cepa LBIT-1200 se emplearon iniciadores degenerados diseñados para reconocer regiones conservadas de cada una de las familias de genes *vip1*, *vip2* y *vip3*. Las secuencias y temperaturas de alineamiento de estos iniciadores se muestran en la Tabla 4. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Hernández-Rodríguez y col. (2009). Se preparó una mezcla de reacción para el PCR que contenía 100 ng de cada iniciador, 100 ng de DNA genómico, 0.1mM de MgSO₄, 0.8 mM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA Polimerasa High-Fidelity (Invitrogen) y un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 94° C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 45 segundos a 94° C, alineamiento de 45 segundos a la temperatura apropiada y extensión de 1.5 min. a 72° C con un paso final de extensión de 7 min. a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido. Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron 2 µl que se cargaron en geles de agarosa al 1% y buffer 1X Tris-acetato-EDTA (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y se corrieron durante 45 minutos a 90 V. Posteriormente se tiñeron con GelRed 1X (Biotium) y se fotografiaron en el sistema Gel DocTM XR+ Gel Documentation system (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb Plus (Invitrogen). Se emplearon también en este estudio como controles positivos las cepas: HD-1 para los genes *vip3* y LBIT-441 para los genes *vip1* y *vip2*.

Tabla 4. Secuencia de nucleótidos y temperatura de alineamiento de los iniciadores empleados en la detección de genes *vip*.

Genes	Secuencia de nucleótidos	Temp °C
<i>vip1</i>	Vip1F 5'- cagtctattcgttgattggtt-3'	50
	Vip1R 5'- cattcacacttgaaaagcagc-3'	50
<i>vip2</i>	Vip2F 5'- gaaaaagagtggaaactactg-3'	52
	Vip2R 5'- tactcatatatectttgtattc-3'	52
<i>vip3</i>	Vip3F 5'- cattccacgatgtaatgtagg-3'	50
	Vip3R 5'- gttgaataactatctaactgaac-3'	50

VI 15. Análisis de la secuencia de los genes que condifican para la subunidad 16s del RNA ribosomal y la subunidad B de la gisrasa (*gyrB*).

Se realizó el análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes 16s RNAr y *gyrB* de la cepa LBIT-1200. Los iniciadores empleados para la amplificación del gen 16s RNAr fueron los siguientes: Uf 5'- agagtttgatcatggctcag-3' y Ur 5'- ggactaccagggtatcta-3' (. Se preparó una mezcla de reacción para el PCR que contenía 100 ng de cada iniciador, 100 ng de DNA genómico, 0.1mM de MgSO₄, 0.8 mM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA Polimerasa High-Fidelity (Invitrogen) y un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación para amplificar el gen 16s RNAr fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 94° C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 30 segundos a 94° C, alineamiento de 30 segundos a la temperatura de 53° C y extensión de 45 segundos a 72° C con un paso final de extensión de 7 minuto a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido.

Para la amplificación del gen *gyrBF* se emplearon los siguientes iniciadores: *gyrBF*5'-atggaacaaaagcaaatg-3' y *gyrBR* 5'-ttaaatatcaaggttttca -3 (Soufiane y Côté, 2009). Se preparó una mezcla de reacción para el PCR que contenía 100 ng de cada iniciador, 100 ng de DNA genómico, 0.1mM de MgSO₄, 0.8 mM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA Polimerasa High-Fidelity (Invitrogen) y un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 95° C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 1 minuto a 95° C, alineamiento de

30 segundos a la temperatura de 46° C y extensión de 30 segundos a 72° C con un paso final de extensión de 7 minutos a 72° C y conservación a 4° C el tiempo requerido.

Para visualizar los productos de PCR se utilizaron 2 µl que se cargaron en geles de agarosa al 1% y buffer 1X Tris-acetato-EDTA (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y se corrieron durante 45 minutos a 90V. Posteriormente se tiñeron con GelRed 1X (Biotium) y se fotografiaron en el sistema Gel Doc TM XR+ Gel Documentation System (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb Plus (Invitrogen). De los productos de PCR se tomaron 20 µl y se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen USA. Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis Blast en el sitio web https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch para identificar semejanzas y diferencias entre la cepa LBIT-1200 y otras cepas que pertenecen al mismo serotipo.

VI 16. Detección de genes *cry* con iniciadores universales

Para detectar la presencia de genes *cry* se emplearon tres pares de iniciadores degenerados diseñados por Noguera e Ibarra, 2010. La secuencia de cada uno de los iniciadores así como sus respectivas temperaturas de alineamiento se muestran en la Tabla 5. Las combinaciones de iniciadores para la detección de genes *cry* fueron las siguientes: Bloque 1 y Bloque 5, Bloque 2 y Bloque 5 y finalmente Bloque 1 y Bloque 4. Para cada combinación se preparó una mezcla de reacción para PCR que contenía 100 ng de cada iniciador, 100 ng de DNA genómico, 0.1mM de MgSO₄, 0.8 mM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA Polimerasa High-Fidelity (Invitrogen) y un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 94 °C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 1 minuto a 94° C, 2 minutos de alineamiento a la temperatura específica de cada par de iniciadores y extensión de 1 minuto y medio a 72° C con un paso final de extensión de 7 minutos a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido. Para visualizar los productos de PCR se utilizaron 2 µl que se cargaron en geles de agarosa al 1% y buffer 1X Tris-acetato-EDTA (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y se corrieron durante 45 minutos a 90 V. Posteriormente se tiñeron con GelRed 1X (Biotium) y se fotografiaron en el sistema Gel Doc TM XR+ Gel

Documentation System (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb Plus (Invitrogen).

Tabla 5. Secuencia de nucleótidos y temperatura de alineamiento de los iniciadores empleados para la detección de genes *cry*.

Iniciadores	Secuencia de nucleótidos	Temp °C
Bloque 1	5'- tatgcicaagcagcMaatttWcatYt-3'	45
Bloque 2	5'- ttagatattgttgcaWtatKKYc-3'	47
Bloque 4	5'- cataacgtagWYttaYctKaWt-3'	45
Bloque 5	5'- ggaataaattcaattYKRtcWa-3'	45

VI 17. Clonación, análisis de restricción, secuenciación y análisis de secuencia de los fragmentos de genes *cry* obtenidos

Los productos de PCR se clonaron células quimiocompetentes de *E.coli* Top 10 usando el vector de clonación pCRTM4-TOPO[®] (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se seleccionaron un grupo de clonas y se cultivaron en LB con carbenicilina a 37° C con agitación durante 12 horas. De cada cultivo se colectaron muestras de 2 ml y se extrajo el DNA plasmídico por el método estándar de lisis alcalina (Sambrook, 2001). Enseguida el DNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, para confirmar las bandas de DNA recombinante.

Para discriminar todos los genes que pudieran migrar de manera similar en los productos de amplificación se realizó un análisis de restricción de las clonas seleccionadas. Este análisis se realizó con las enzimas *EcoRI*, *EcoRV*, *Sau3AI* y *AluI* (Invitrogen), usando las indicaciones descritas por el fabricante. El análisis de restricción para diferenciar entre clonas se realizó en un volumen final de 20 µl de los cuales 1 µl de DNA (1 µg/µl), 16 µl de agua, 2 µl de buffer y 1 µl de enzima. Se incubaron a 37° C por 1 hora. El resultado de las digestiones se observó por electroforesis en un gel de agarosa 1%. Se seleccionaron un grupo de clonas para enviar a secuenciar 20 µl de DNA plasmídico en la empresa Magrogen USA. Al obtener las secuencias se realizó un análisis Blast en el sitio web https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch para identificar a qué

holotipo y grupo específico de genes *cry* corresponde el fragmento de gen que se amplificó con los iniciadores universales.

VI 18. Diseño de iniciadores para la amplificación de genes *cry* completos y análisis de secuencia.

Al identificar el gen *cry* se procedió a diseñar iniciadores específicos para amplificar el gen completo teniendo en cuenta que anteriormente sólo se obtuvo un fragmento del mismo. Con estos nuevos iniciadores se procedió a la amplificación del gen completo y para lo cual se preparó una mezcla de PCR que contenía 100 ng de cada iniciador, 100 ng de DNA genómico, 0.1mM de MgSO₄, 0.8 mM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA Polimerasa High-Fidelity (Invitrogen) y un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 95° C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 1 minuto a 95° C, alineamiento de 1 minuto a una temperatura de 50° C y extensión de 3 minutos a 72° C con un paso final de extensión de 7 minutos a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido. Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron 2 µl que se cargaron en geles de agarosa al 1% y buffer 1X Tris-Acetato-EDTA y se corrieron durante 45 minutos a 90V. Posteriormente se tiñeron con GelRed 1X (Biotium) y se fotografiaron en el sistema Gel Doc TM XR+ Gel Documentation system (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb Plus (Invitrogen).

Los productos de PCR se clonaron en células quimiocompetentes de *E.coli* Top 10 usando el vector de clonación pCR™4-TOPO® (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se seleccionaron un grupo de clonas y se cultivaron en LB con carbenicilina a 37° C con agitación durante 12 horas. De cada cultivo se colectaron muestras de 2 ml y se extrajo el DNA plasmídico por el método estándar de lisis alcalina. Enseguida el DNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, para confirmar las bandas de DNA recombinante. Se tomaron del DNA plasmídico 20 µl de diferentes muestras y se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen USA y la secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo a aminoácidos empleando el programa Mega 6.0 y se sometió a un análisis exhaustivo empleando los programas Mega 6.0 y Clustal Omega en el

sitio web <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> para detectar diferencias en la secuencia de aminoácidos de este gen con respecto a otros que pertenecen a su mismo holotipo y realizar un análisis filogenético. Finalmente la secuencia se depositó en las bases de datos del Genbank.

VI 19. Mutagénesis dirigida

Se realizó un procedimiento de mutagénesis dirigida para realizar sustituciones de aminoácidos en la proteína Cry1Ac de la cepa estándar HD-73. Los aminoácidos que se sustituyeron están presentes en regiones específicas de la secuencia de la proteína Cry que produce nuestra cepa de estudio LBIT-1200. La metodología empleada fue el procedimiento de mutagénesis dirigida por PCR que implica el uso de iniciadores que contienen las secuencias mutadas que se desean cambiar en un gen determinado. Los iniciadores que contienen estas mutaciones se traslapan en los extremos y mediante PCR se obtienen los plásmidos mutados (Fig 4).

VI 19.1. Mutagénesis dirigida. Diseño de iniciadores

El proceso de mutagénesis dirigida por PCR comenzó con la selección de los vectores de clonación y el diseño de los iniciadores mutagénicos empleando el programa de bioinformática Annhyb 4.9 a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *cry1Ac* de la cepa HD-73. Los vectores de clonación empleados fueron los plásmidos: pJET 1.2 (ThermoFisher) y pSTAB (Fig 5), el pJET 1.2 se empleó directamente en el proceso de mutagénesis dirigida por PCR mientras que el pSTAB se utilizó como vector de expresión de las proteínas Cry mutadas en la cepa acristalífera de LBIT-601. Se diseñaron en total 10 pares de iniciadores, un par de iniciadores se utilizó para amplificar la secuencia completa del gen *cry1Ac* de la cepa HD-73 y presentan sitios de corte en los extremos para las enzimas de restricción *SalI* y *SphI* (iniciadores CfSal y Cr), estos sitios de corte permiten la ligazón de este gen en el vector en el sentido correcto para la expresión de la proteína. Otros dos pares de iniciadores con las sustituciones de nucleótidos seleccionadas se emplearon para obtener los genes *cry1Ac* mutados mediante PCR (Mut2f y Mut2r, R574Gf y R574Gr) (Tabla 6).

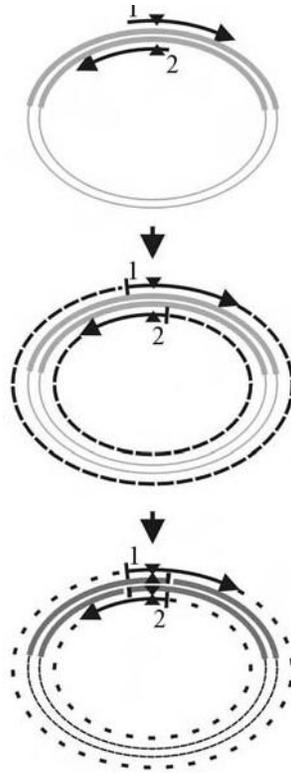


Figura 4. Esquema general de la metodología de Mutagénesis Dirigida por PCR

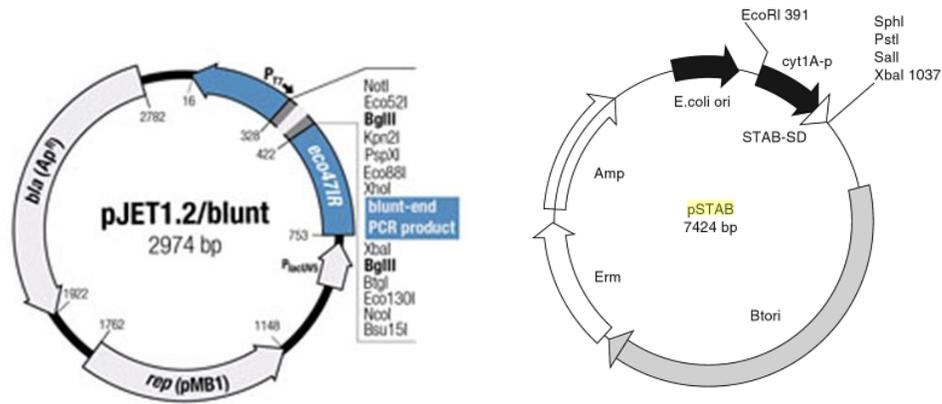


Figura 5. Vectores de clonación empleados en los procedimientos de mutagénesis dirigida.

Se diseñaron además dos pares de iniciadores para facilitar el proceso de secuenciación y confirmar la presencia de las diferentes mutaciones en el gen *cryIAC* (SMf y SMr, SM2f y SM2r) (Tabla 6).

Como primer paso se procedió a amplificar mediante PCR el gen *cryIAC* de HD-73. Se preparó una mezcla de reacción para el PCR que contenía 100 ng de cada iniciador (mencionado anteriormente), 100 ng de DNA genómico, 5 µl de Buffer 5X HF, 0.8 mM de dNTPs, 0.4 U de la enzima Phusion High Fidelity DNA polimerasa (ThermoFisher) y un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 30 segundos a 98° C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 30 segundos a 98° C, alineamiento de 30 segundos a la temperatura de 55° C y extensión de 1 minuto y 30 segundos a 72° C con un paso final de extensión de 7 minutos a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido.

Tabla 6. Iniciadores empleados en la Mutagénesis Dirigida por PCR. Se representan en letras mayúsculas sitios de corte de enzimas de restricción o sitios de sustitución de codones según sea el caso.

Iniciador	Secuencia 5'-3'
Cr	GCATGCctattcctccataaggagt
CFSal	GTCGACgataacaataaca
Mut2f	cgtaattggggtTACtcatccatt
Mut2r	Ttgaaaaaatggatgagtaacccc
R574Gf	gtgataatagacGGGtttgaatttat
R574Gr	Tacgcctcgagtgttcagtaactgg
SMf	Atggttctgtaatttcaggacc
SMr	Atgttgactttctcggacaat
SM2f	Tatggcttcagcccaaag
SM2r	Tagccgtgacacccggaat

Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron 2 µl que se cargaron en geles de agarosa al 1% y buffer 1X Tris-Acetato-EDTA y se corrieron durante 45 minutos a 90 V. Posteriormente se tiñeron con GelRed 1X (Biotium) y se fotografiaron en el sistema Gel Doc TM XR+ Gel Documentation system (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb Plus (Invitrogen).

VI 19.2. Mutagénesis dirigida. Obtención de genes mutados mediante PCR

Los productos de PCR provenientes de la amplificación anterior se clonaron en células electrocompetentes de la *E.coli* DH5a usando el vector de clonación pJET 1.2 y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se seleccionaron un grupo de clonas y se cultivaron en LB con carbenicilina a 37 °C con agitación durante 12 horas. Se colectaron muestras de 2 ml y se extrajo el DNA plasmídico por el método estándar de lisis alcalina. Enseguida el DNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, para confirmar las bandas de DNA recombinante. El DNA plasmídico obtenido se empleó como templado para la obtención de los mutantes mediante PCR. El objetivo principal era obtener dos mutantes que presentaran una sola sustitución de codones diferentes y un doble mutante que presentara de manera conjunta las dos mutaciones antes mencionadas.

Para obtener las dos sustitución de aminoácidos por separado se preparó una mezcla de reacción para el PCR que contenía 100 ng de cada iniciador (Mut2f y Mut2r, y otro con R574Gf y R574Gr), 100 ng de DNA plasmídico, 5 µl de Buffer 5X HF, 0.8 mM de dNTPs, 0.4 U de la enzima Phusion High Fidelity DNA polimerasa (ThermoFisher) y un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 30 segundos a 98° C, 30 ciclos que consistían cada uno en desnaturalización de 30 segundos a 98° C, alineamiento de 30 segundos a la temperatura de 48° C y extensión de 1 minuto y 30 segundos a 72° C con un paso final de extensión de 7 minutos a 72° C y una conservación a 4° C, el tiempo requerido. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1%. Posteriormente los productos de PCR se digirieron con la enzima *DpnI* (NEB) con el objetivo de eliminar el DNA parental usado como templado en el PCR (la enzima digiere el DNA metilado) en un volumen de reacción de 50 µl que contiene 1U de la enzima, 1 µg de DNA plasmídico y 5 µl de Buffer 1X CutSmart.

La mezcla se incubó durante 2 horas de 37 °C. El resto del DNA plasmídico se clonó en células electrocompetentes de *E.coli* DH5α y se cultivaron en LB con carbenicilina a 37 °C con agitación durante 12 horas. Se colectaron muestras de 2 ml de diferentes clonas (aproximadamente 24 clonas por cada mutación) y se extrajo el DNA plasmídico por el método estándar de lisis alcalina. Enseguida el DNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, para confirmar las bandas de DNA recombinante.

El DNA plasmídico se purificó con el kit PureLink™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron 10 µl del DNA de diferentes clonas y se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen USA empleando los iniciadores (SMf y SMr y SM2f y SMr). Una vez obtenida la secuencia se procedió al análisis de las mismas con el programa SnapGen 3.1 con el objetivo de corroborar la presencia de las mutaciones introducidas en la secuencia de nucleótidos. El DNA plasmídico de las clonas positivas se conservó a -70° C hasta su uso.

Para obtener la doble mutación se realizó exactamente el mismo procedimiento descrito anteriormente para las mutaciones simples, sólo que en este caso se utilizó como DNA parental para el PCR mutagénico DNA plasmídico de clonas ya mutadas de manera tal que a una clona con el gen mutado se le introdujo mediante PCR una segunda mutación obteniendo de esta manera la doble mutante. Los procesos de clonación, secuenciación y análisis de secuencia de las clonas se realizaron de la manera antes descrita y empleando los iniciadores (SMf y SM2r).

VI 20. Expresión de proteínas mutantes en la cepa acrístálfera LBIT-601

Se seleccionaron clonas positivas que contuvieran cada una de las mutaciones puntuales y la doble mutación. Se procedió entonces a la digestión de las mismas con las enzimas *SalI* y *SphI*, con el objetivo de liberar el gen mutado del vector pJET 1.2, en un volumen final de reacción de 20 µl que contenía: 2U de cada una de las enzimas de restricción, 1µg de DNA plasmídico y 2 µl del buffer 10X. La digestión se incubó a 37 °C durante 2 horas. Se visualizaron los productos de la digestión en geles de agarosa al 1% y

se purificaron las bandas de interés con el kit PureLink™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los genes mutantes purificados se ligaron al vector pSTAB con la enzima T4DNA ligasa (Invitrogen) empleando 1 U de la enzima, una relación molar inserto/vector de 3:1 y 5 µl de buffer de ligazón. Se incubó la reacción a 26 °C toda la noche. Con las construcciones obtenidas se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5α que se cultivaron en LB con carbenicilina a 37 °C con agitación durante 12 horas. Se colectaron muestras de 2 ml y se extrajo el DNA plasmídico por el método estándar de lisis alcalina. Se comprobó la presencia de construcciones adecuadas mediante digestión con las enzimas *SalI* y *SphI* seguido de visualización mediante electroforesis en geles de agarosa. Las clonas positivas se conservaron a -70 °C hasta su uso.

Posteriormente con el DNA plasmídico de las clonas positivas se transformaron células electrocompetentes de la cepa acristalífer LBIT-601 y se cultivaron en Agar para Métodos Estandar con eritromicina a 28° C. Las células transformadas obtenidas se cultivaron luego en medio Leche Peptonizada para su liofilización y posterior uso en bieonsayos comparativos con lepidópteros.

VI 21. Microscopía electrónica de cepas de *B. thuringiensis* mutantes

Para analizar la morfología y el tamaño de los cristales de las cepas mutantes obtenidas anteriormente se empleó una técnica de tinción negativa y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) siguiendo la misma metodología descrita anteriormente en este capítulo. De cada fotografía tomada por cada mutante se midieron un total de entre 80 y 150 cristales y se determinó el valor medio de las mediciones para comparar las longitudes de los mismos por análisis estadístico.

VI 22. Bioensayos para determinar la CL_{50} de las cepas mutantes frente a *M. sexta* y *T. ni*

Los bioensayos con las cepas mutadas se realizaron contra larvas de los lepidópteros *M. sexta* y *T. ni*. Las condiciones empleadas fueron las mismas que se describieron anteriormente en este capítulo. Se emplearon 6 dosis con concentraciones diferentes del complejo spora-cristal de cada cepa mutante que fueron ajustadas para determinar las CL_{50} y un valor mínimo de tres réplicas por cada dosis. Como control negativo se adicionó a las cajas Petri con dieta artificial una solución de Tween 80 al 0.02 %. En estos bioensayos también se incluyeron como controles las cepas acristalíferas transformadas con los genes *cryIAc* de HD-73 y LBIT-1200 respectivamente. Para determinar la CL_{50} se utilizaron los cristales puros de esta cepa frente a estos insectos. Los datos de mortalidad obtenidos en estos bioensayos que cumplieron con ciertos requisitos estadísticos, se procesaron mediante análisis estadístico PROBIT para estimar la CL_{50} .

VII RESULTADOS

VII 1. Evaluación de la toxicidad *Bacillus thuringiensis* LBIT-1200 mediante bioensayos preliminares

La cepa LBIT-1200, aislada en 2012 a partir de suelo, solo mostró 100 % de toxicidad en los bioensayos preliminares de alta dosis (10 mg/ml) ante los lepidopteros *M. sexta*, *T. ni* y *S. frugiperda* (Figura 6). No se observó mortalidad alguna en los bioensayos con *T. molitor*, *G. mellonella*, *C. elegans* y *A. aegypti*.

A

B

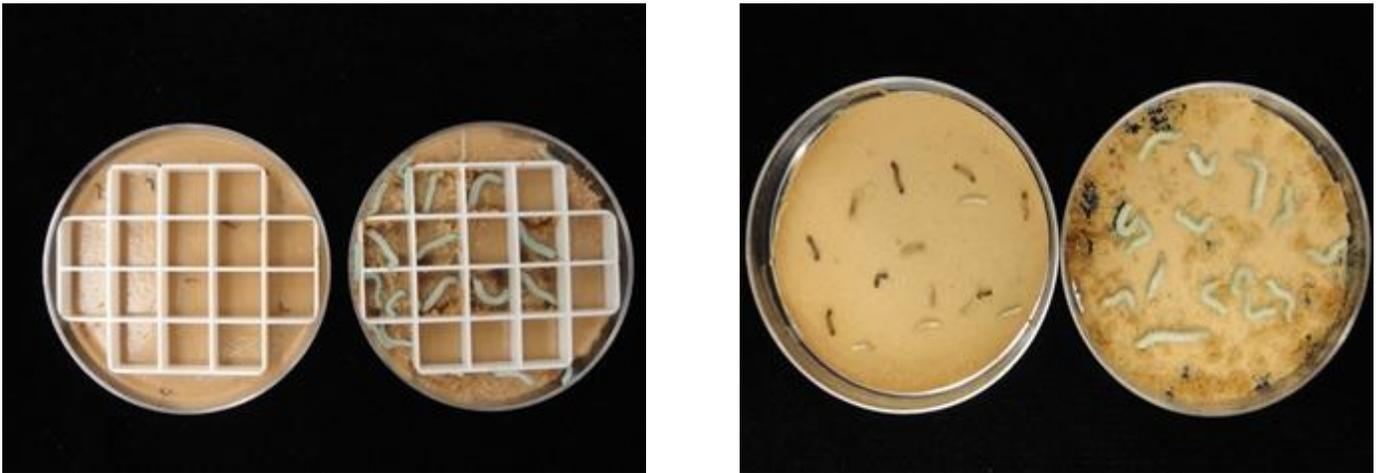


Figura 6. Bioensayos preliminares con la cepa LBIT-1200 frente a *M. sexta* (A) y *T. ni* (B). A la izquierda se muestran los tratamientos con espора-criстал de la cepa LBIT-1200 y a la derecha los controles negativos tratados con una solución de Tween 80 a una concentración de 0.02 %.

En los bioensayos con *L. texana* no se observó disminución del peso de las larvas con respecto al control, por tanto no hubo efecto tóxico sobre las mismas. La cepa LBIT-441 empleada como control positivo en este bioensayo produjo la muerte de todas las larvas tratadas. No se observó mortalidad en el control negativo.

VII 2. Bioensayos con lepidópteros para determinar la concentración letal media (CL₅₀) empleando el complejo espora-cristal.

Debido a que sólo algunos lepidópteros fueron susceptibles a la cepa LBIT-1200 se procedió a determinar la concentración letal media para cada uno de ellos. Se realizaron varios bioensayos para cada insecto y se seleccionaron aquellos que cumplieron con los parámetros específicos. La concentración letal media de LBIT-1200 estimada para *M. sexta* tuvo un valor de 3.42 ng/cm², mientras que para la cepa HD-73 tuvo un valor de 21.87 ng/cm². La cepa LBIT-1200 es 7 veces más tóxica contra *M. sexta* que la cepa estándar HD-73 (Tabla 7). Por otra parte el valor de la concentración letal media de LBIT-1200 para *T. ni* fue 11.45 ng/cm² y para HD-73 108.67 ng/cm². En estos bioensayos también se demostró que la cepa LBIT-1200 es mucho más tóxica que HD-73, con una concentración letal media 10 veces menor.

Tabla 7. Concentración letal media de la cepa LBIT-1200 para *M. sexta* y *T. ni* empleando complejo espora-cristal.

<i>M. sexta</i>				
Cepa	CL ₅₀	LF	χ^2	Pendiente
LBIT-1200	3.4	2.36 – 4.89	2.46	2.51
HD-73	21.87	18.6 – 25.6	3.16	3.8
<i>T. ni</i>				
LBIT-1200	11.45	9.39 – 13.68	2.56	2.52
HD-73	108.67	90.04 – 131.15	2.23	2.45

FL-Límites fiduciales

Durante los bioensayos para determinar la CL₅₀ de la cepa LBIT-1200 hacia *M. sexta* y *T. ni* se observó que en aquellos bioensayos en los que se empleó una concentración menor del complejo espora cristal y que tuvieron en consecuencia un menor porcentaje de mortalidad, las larvas que permanecieron vivas presentaban un menor tamaño en comparación con el control no tratado (Figura 7).

En el caso de *S. frugiperda* no se logró determinar un valor de concentración letal media debido a que al aplicar las diferentes diluciones del complejo espora-cristal, similares a las utilizadas en las otras dos especies, en la dieta de las larvas no se logró obtener mortalidad. Únicamente con una concentración del complejo espora-cristal de 10

mg/ml se observó mortalidad para *S. frugiperda*. Sin embargo en todas las diluciones empleadas se observó la disminución del tamaño de las larvas tratadas, como se describió anteriormente para *T. ni* y *M. sexta*. Así como también disminución de la ingesta.



Figura 7. Efectos subletales en larvas de *T. ni* al ser tratadas con bajas concentraciones del complejo esporecristal de la cepa LBIT-1200. A la derecha se muestran los tratamientos con el complejo esporecristal de la cepa LBIT-1200 y a la izquierda los controles negativos tratados con una solución de Tween 80 a una concentración de 0.02 %.

VII 3. Bioensayos con lepidópteros para determinar la concentración letal media (CL₅₀) empleando cristales puros

Se determinó el valor de la concentración letal media de las cepas LBIT-1200 y HD-73 para *M. sexta* y *T. ni* empleando cristales puros de ambas cepas. Para ello inicialmente se obtuvo el complejo esporecristal a partir de cultivos líquidos de ambas cepas. Los cristales puros se obtuvieron mediante gradiente discontinuo en sacarosa (Figura 8).

Empleando cristales puros la cepa LBIT-1200 mostró una CL₅₀ para *M. sexta* de 4.763 ng/cm² mientras que HD-73 mostró una CL₅₀ de 22.81 ng/cm². Para *T. ni* se obtuvieron valores de CL₅₀ de 15.35 ng/cm² y 117.4 ng/cm² para LBIT-1200 y HD-73 respectivamente. Se demostró mediante estos bioensayos que los cristales puros de la cepa LBIT-1200 muestran una toxicidad cuatro veces mayor a la de los cristales de la cepa HD-73 para *M. sexta*. Mientras que para *T. ni* se determinó que los cristales puros de LBIT-1200 son 7 veces que los cristales de HD-73.

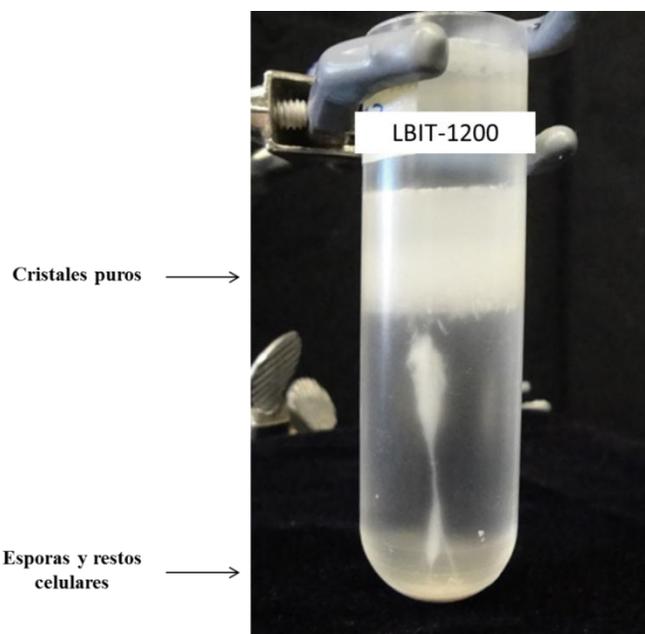


Figura 8. Obtención de cristales puros de la cepa LBIT-1200 empleando gradiente discontinuo de sacarosa.

Tabla 8. Concentración letal media de la cepa LBIT-1200 para *M. sexta* y *T. ni* empleando cristales puros.

<i>M. sexta</i>				
Cepa	CL ₅₀ (ng/cm ²)	LF	χ^2	Pendiente
LBIT-1200	4.763	2.2394	4.386424	2.14655
HD-73	22.819	18.559-27.712	4.184883	2.00215
<i>T. ni</i>				
LBIT-1200	15.355	10.77-21.893	1.039959	1.394397
HD-73	117.4	91.2-133.4	2.45328	2.687743

VII 4. Determinación de la morfología de los cristales de la cepa LBIT-1200

Mediante microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa se determinó la morfología de los cristales de la cepa LBIT-1200. Se observaron únicamente cristales de morfología bipiramidal y con un tamaño promedio de 1.41 μm y una desviación estándar de 0.03 μm . Los cristales de la cepa LBIT-1200 son un 34 % mayores en longitud que los producidos por la cepa estándar HD-73 (Figura 9).

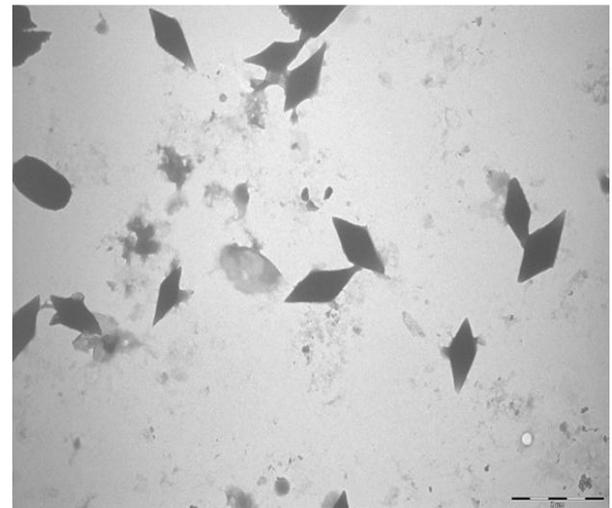
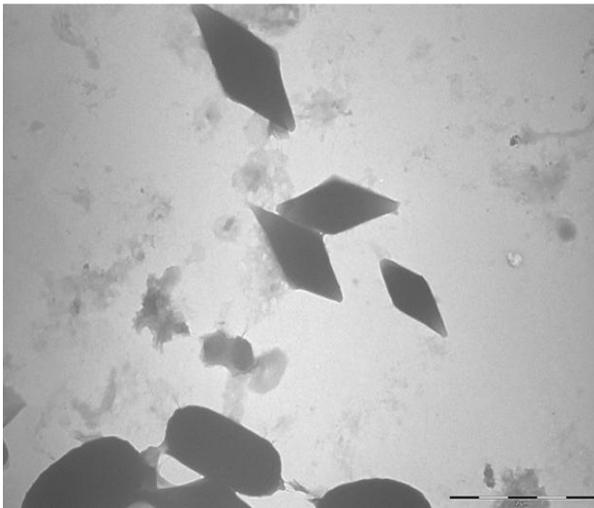
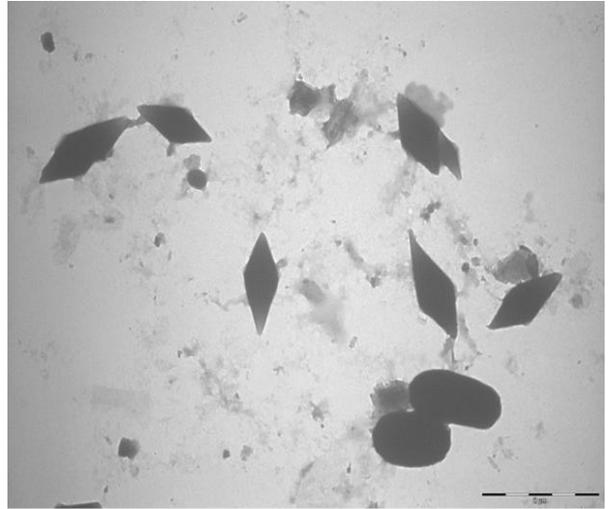
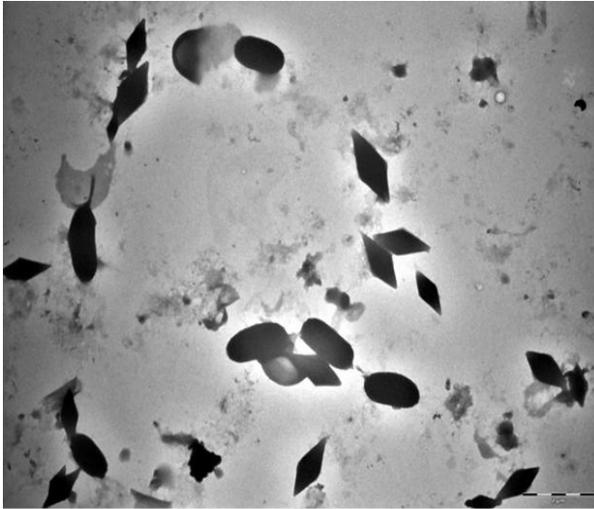


Figura 9. Morfología de los cristales de la cepa LBIT-1200 observada mediante tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión.

VII 5. Análisis del contenido proteico de los cristales de la cepa LBIT-1200

El análisis del contenido proteico de los cristales de la cepa LBIT-1200 se realizó mediante SDS-PAGE. La cepa HD-1 (carril 2) mostró su patrón de bandas característico, se observaron dos bandas a la altura de los 130 kDa y los 70 kDa. Las cepas LBIT-1200 y HD-73 mostraron similitud en su patrón de bandas proteicas observándose sólo una banda mayor en cada caso con un tamaño aproximado de 130 kDa (Fig 10).

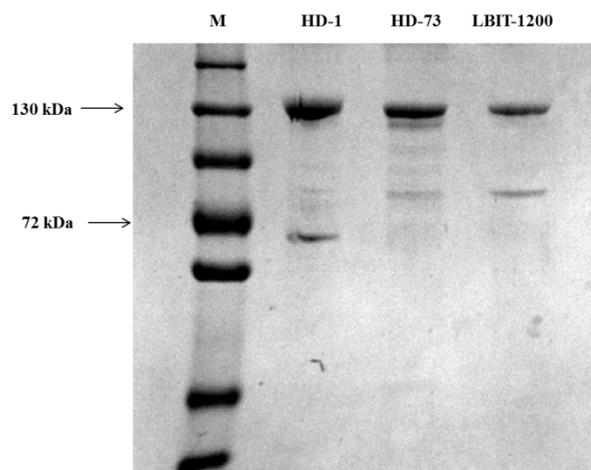


Figura 10. Análisis del contenido proteico de los cristales de la cepa LBIT 1200 mediante SDS-PAGE. Carril 1 Marcador de peso molecular PageRuler™ Plus (Invitrogen).

VII 6. Serotipificación

Se empleó el método convencional de serotipificación para determinar el serotipo de la cepa LBIT-1200 empleando anticuerpos policlonales. Las cepas de diferentes serotipos empleadas como testigos positivos en este estudio reaccionaron de manera positiva (aglutinación) ante su antisuero correspondiente, no ocurrieron reacciones cruzadas con otros antisueros y no hubo reacción de aglutinación en los controles negativos (NaCl 0.85 %). Sin embargo la cepa LBIT-1200 mostró reacciones de aglutinación en solución salina, por lo que se considera como una cepa autoaglutinable por tanto la determinación de su serotipo por este método convencional no se logró determinar.

VII 7. Detección de β -exotoxinas

La detección de β -exotoxina en el cultivo de la cepa LBIT-1200 se realizó mediante bioensayos con el nemátodo de vida libre *C. elegans*. No se observó mortalidad en los nemátodos tratados con el sobrenadante del cultivo líquido de la cepa LBIT-1200, por lo que podemos confirmar que la cepa no produce β -exotoxina. Tampoco se observaron variaciones en la morfología de los nemátodos. El tratamiento con el sobrenadante de la cepa control NRD-12 provocó la muerte de todos los nemátodos tratados y en el control negativo no hubo mortalidad en la población de nemátodos.

VII 8. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la flagelina

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la flagelina se realizó mediante amplificación por PCR del gen que condifica para la misma. Se obtuvo un amplicón con un tamaño aproximado de 800 pb (Fig. 11).

Al obtener la secuencia de nucleótidos del gen amplificado se tradujo la misma a secuencia de aminoácidos empleando el programa MEGA 6.0 (Anexo 1) y se sometió la misma a un análisis BLAST. Se determinó entonces que la cepa LBIT-1200 pertenece al serotipo *kurstaki* con un 99 % de indentidad en relación a 9 cepas de *B. thuringiensis* que pertenecen igualmente al serotipo *kurstaki*.

Posteriormente se realizó un análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos de la flagelina de la cepa LBIT-1200 empleando las secuencias de otras cepas que corresponden a diferentes serotipos y algunas que pertenecen al serotipo *kurstaki*. La secuencia de la cepa LBIT-1200 se ubica en un mismo grupo junto a otras cepas del mismos serotipo y del serotipo *alesti* que poseen el antígeno flagelar H3 muy similar al H3a3b3c de *kurstaki* (Fig 12).

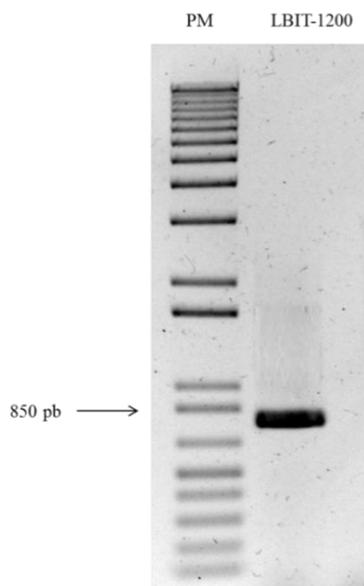


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la amplificación mediante PCR del gen *hag* (flagelina). Carril 1: Patrón de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen), carril 2: LBIT-1200.

VII 9. Análisis de secuencias multilocus

Para el análisis de secuencias multilocus se amplificaron y analizaron las secuencias concatenadas de siete genes constitutivos (ver Materiales y Métodos). Mediante PCR se amplificaron todos los fragmentos de los genes y mostraron un tamaño variable entre 550 y 650 pb (Figura 13). Al obtener las secuencias de cada uno de los genes analizados se procedió al análisis de las mismas (Anexo 2) y se le asignó un número de alelo a cada una, de acuerdo al sistema de comparación del programa con la base de datos en el sitio Web <http://pubmlst.org/bcereus/> (Tabla 9). La combinación de alelos obtenida corresponde a la secuencia tipo del serotipo *kurstaki* y no se obtuvieron nuevas combinaciones alélicas.

Tabla 9. Combinaciones alélicas de genes constitutivos y secuencia tipo de la cepa LBIT-1200 correspondientes al serotipo *kurstaki*

<i>glpF</i>	<i>Gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>pur</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>	ST
7	8	16	13	2	16	7	8

ST-Secuencia tipo

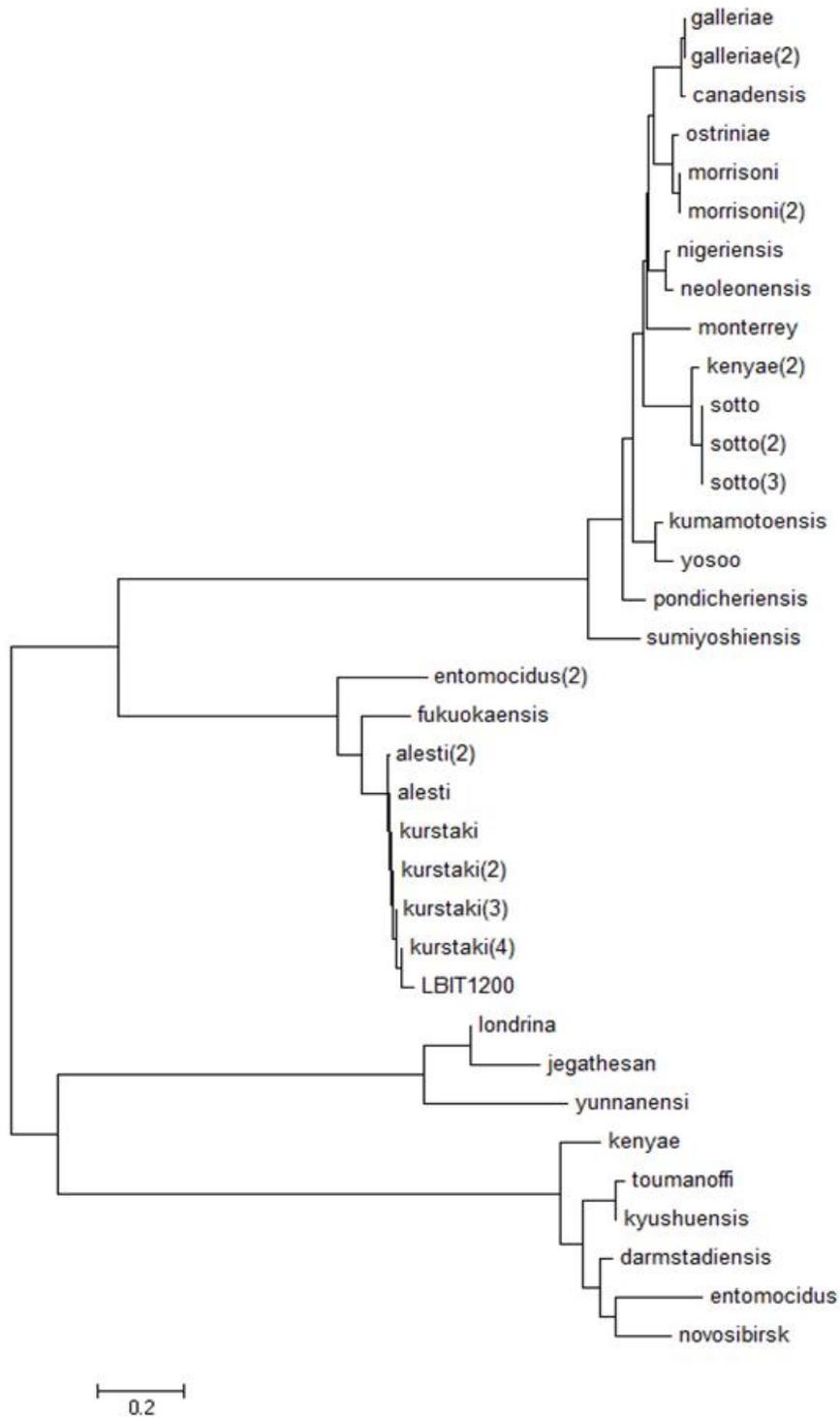


Figura 12. Árbol Neighbor-joinig donde se muestran las relaciones filogenéticas entre diferentes serotipos de *B. thuringiensis* en base a la secuencia de aminoácidos de la flagelina. La cepa LBIT-1200 se ubica en el grupo *kurstaki*.

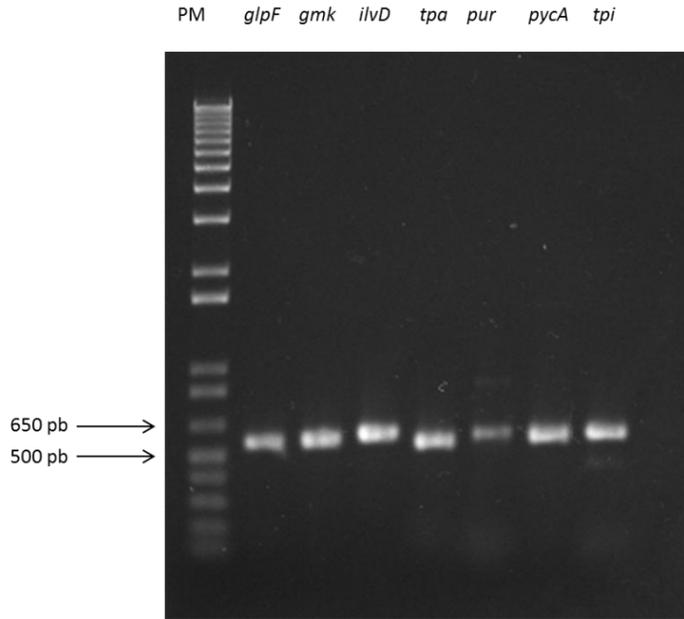


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la amplificación mediante PCR de fragmentos de siete genes constitutivos de *B. thuringiensis*. Carril 1: Patrón de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen).

VII 10. Rep-PCR y análisis del perfil de plásmidos

Las cepas LBIT-1200 y HD-73 mostraron patrones de bandas idénticos mediante la técnica de Rep-PCR. Se observaron pocas bandas en ambas cepas con un tamaño aproximado entre 1600 y 400 pb (Figura 14a). De igual forma los patrones de plásmidos de bajo peso molecular de ambas cepas fueron idénticos y se observaron bandas con un tamaño aproximado entre 6.5 y 12 kb (Figura 14b). No se logró establecer diferencias entre las cepas analizadas mediante las técnicas antes descritas.

Teniendo en cuenta estos resultados y otros obtenidos previamente podemos inferir que las cepas LBIT-1200 y HD-73 presentan muchas similitudes en aspectos morfológicos y moleculares. Ambas cepas pertenecen al serotipo *kurstaki* y producen únicamente proteínas Cry de un tamaño aproximado de 130 kDa, estas proteínas a su vez forman cristales con morfología bipirimidial, además ambas cepas presentan patrones de plásmidos de bajo peso molecular y de Rep-PCR idénticos.

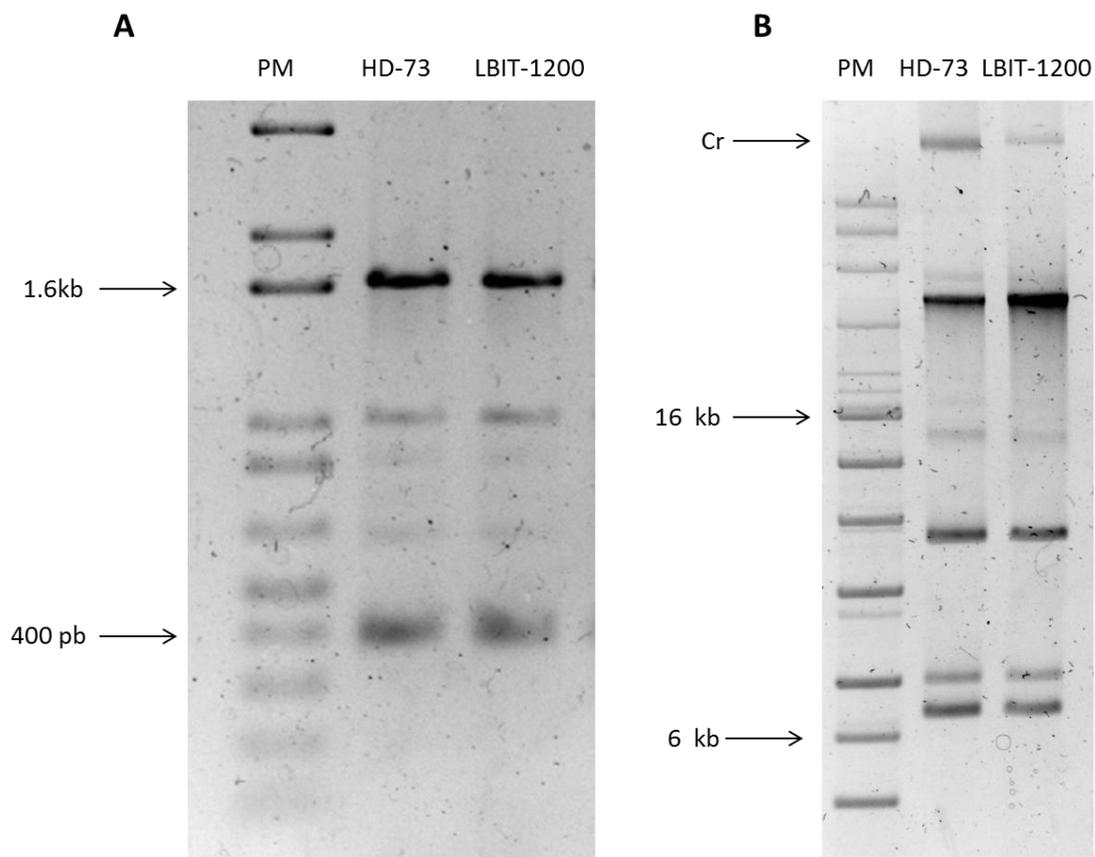


Figura 14. A: Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los patrones de Rep-PCR de las cepas LBIT-1200 y HD-73. Carril 1: Patrón de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen). B: Electroforesis en gel de agarosa 0.6 % de los patrones de plásmidos de las cepas LBIT-1200 y HD-73. Carril 1: Patrón de peso molecular Supercoiled (Invitrogen). Cr: DNA cromosomal.

VII 11. Detección e identificación de genes *vip*

La presencia de genes *vip* de diferentes familias en la cepa LBIT-1200 se detectó mediante PCR. Para los genes del grupo *vip1* y *vip2* se obtuvieron amplicones a partir de la cepa control LBIT-441, con un tamaño aproximado de 600 pb, sin embargo no se obtuvieron productos de amplificación de ninguno de estos genes en la cepa LBIT-1200 (Figura 15 A y B). A partir de la cepa HD-1 empleada como control para la detección de los genes *vip3* se obtuvo un amplicón con tamaño aproximado de 1500 pb y en el caso de la cepa LBIT-1200 no se obtuvieron productos de amplificación (Figura 15 C). Cabe hacer notar que la cepa HD-73 no contiene ninguno de estos genes.

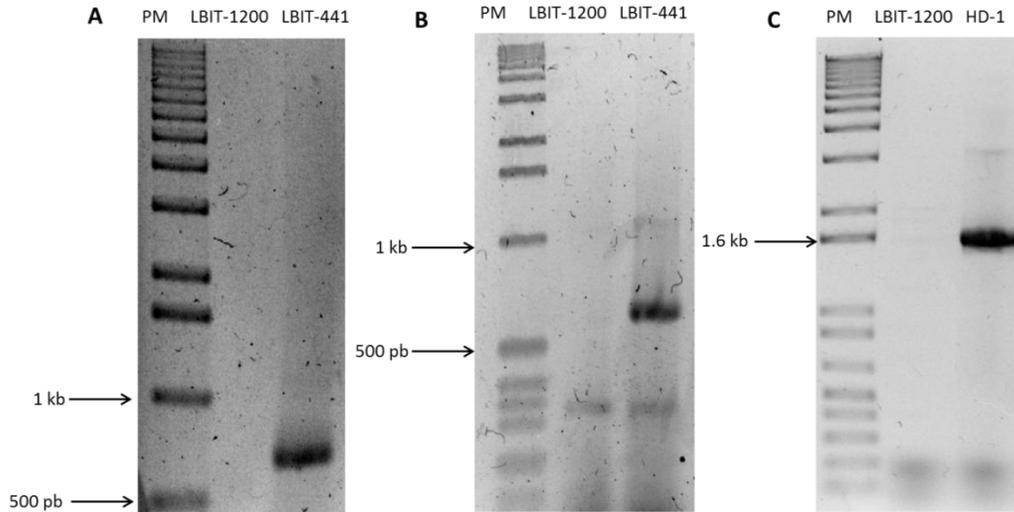


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la amplificación mediante PCR de genes *vip*. A: gen *vip 1*, B: gen *vip 2*, C: *vip 3*. Carril 1: Patrón de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen). La cepa LBIT-1200 no muestra la presencia de ninguno de estos genes

VII 12. Análisis de la secuencia de los genes que condifican para la subunidad 16S del RNA ribosomal y la subunidad B de la girasa (*gyrB*).

Mediante PCR se obtuvieron amplicones de los genes 16S rDNA y *gyrB* a partir de la cepa LBIT-1200. En el caso de *gyrB* se obtuvo un amplicón con un tamaño aproximado de 2 kb mientras que para el 16S rDNA tuvo un tamaño de 1.5 kb aproximadamente (Figura 16 A y B).

El análisis de la secuencia del gen 16s rDNA mostró que la misma posee un 100 % de identidad con 4 cepas de *B. cereus*, 3 cepas de *Bacillus* sp. y 2 cepas de *B. thuringiensis*. Los serotipos de estas dos últimas cepas de *B. thuringiensis* no se conocen. La secuencia tiene un 99 % de identidad con la de HD-73 ya que sólo se detectó un cambio de nucleótido pero de tipo silencioso y sin provocar cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Anexo 3).

La secuencia del gen *gyrB* no mostró un 100 % de identidad con ninguna de las secuencias del mismo gen presentes en la base de datos del GenBank, sin embargo tuvo 99 % de identidad con más de 15 secuencias entre ellas se encontraban las de las cepas

estándar HD-1 y HD-73. Se detectaron 5 cambios de nucleótidos con respecto a la secuencia del gen *gyrB* de la cepa HD-73 y a nivel de aminoácidos se detectaron dos sustituciones (Anexo 4).

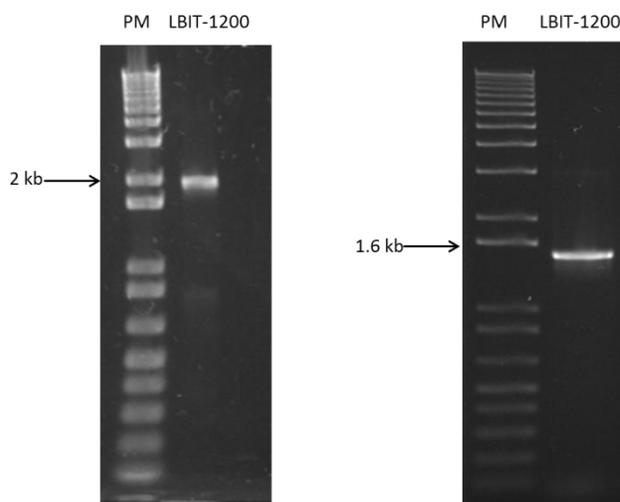


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la amplificación de genes mediante PCR. A: gen *gyrB*, B: gen 16S rDNA. Carril 1: Patrón de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

VII 13. Detección e identificación de genes *cry* con iniciadores universales. Clonación, análisis de restricción, secuenciación y análisis de secuencia de los fragmentos de genes *cry* obtenidos

Se emplearon diferentes combinaciones de iniciadores universales para la detección de genes *cry* en la cepa LBIT-1200. Al combinar los iniciadores 1 y 5 se obtuvo un amplicón de un tamaño aproximado de 1400 pb tanto en el control HD-1 como en nuestra cepa de estudio LBIT-1200 (Figura 17A). Mientras que con la combinación de los iniciadores 2 y 5 los amplicones obtenidos por la cepa LBIT-1200 y la cepa control ISP-82 fueron de distinto tamaño, aproximadamente 550 y 1200 pb, respectivamente (Figura 17B). Por otra parte la última combinación de los iniciadores 1 y 4 no arrojó productos de PCR.

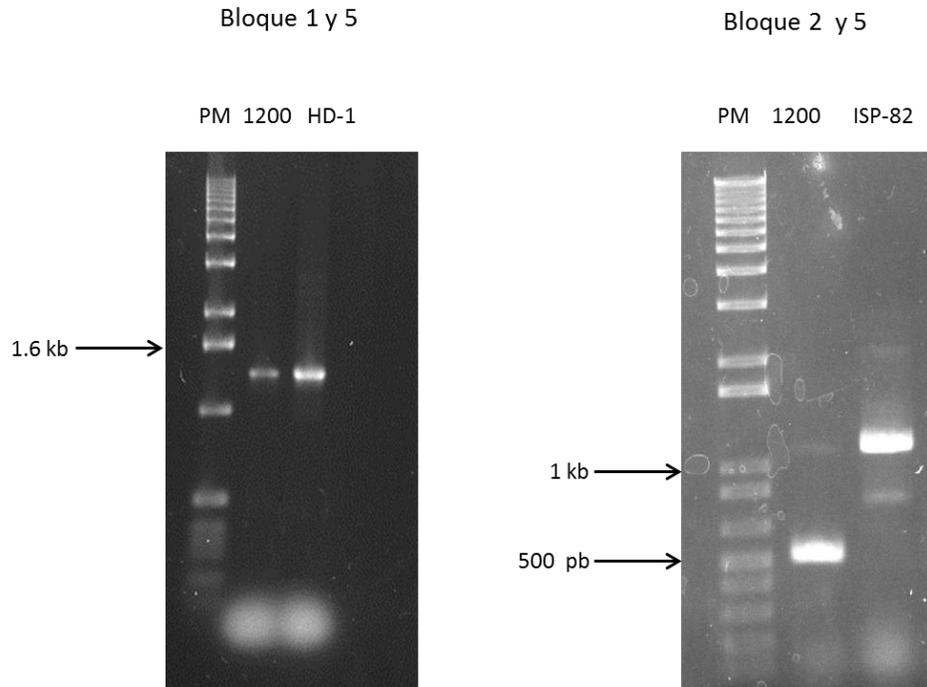


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la amplificación de genes *cry* mediante PCR empleando diferentes combinaciones de iniciadores universales. A: bloques 1 y 5, B: bloques 2 y 5. Carril 1: Patrón de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

Los productos de PCR se clonaron en el vector pCRTM4-TOPO[®] y se realizaron análisis de restricción de diferentes clonas debido a que el uso de los iniciadores universales para la amplificación de fragmentos de genes *cry* puede provocar la presencia de más de un gen *cry* en un mismo tamaño de amplicón. Los análisis de restricción se realizaron empleando las enzimas *EcoRI*, *EcoRV*, *AluI* y *Sau3AI*, no se observaron diferencias entre los patrones de restricción de las clonas (Figura 18).

Se seleccionaron un grupo de clonas para secuenciar los productos de PCR. El análisis de las secuencias reveló que el fragmento amplificado con los iniciadores de los bloques 1 y 5 corresponde al grupo de genes tipo *cryIAc*, sin embargo muestra un 99 % de identidad con todos genes *cryIAc* reportados en bases de datos hasta la fecha. Al comparar este fragmento de gen con el de la cepa HD-73 se detectaron tres sustituciones de

nucleótidos que además no se encuentran en el resto de los genes *cryIAC* reportados a la fecha (Anexo 5)

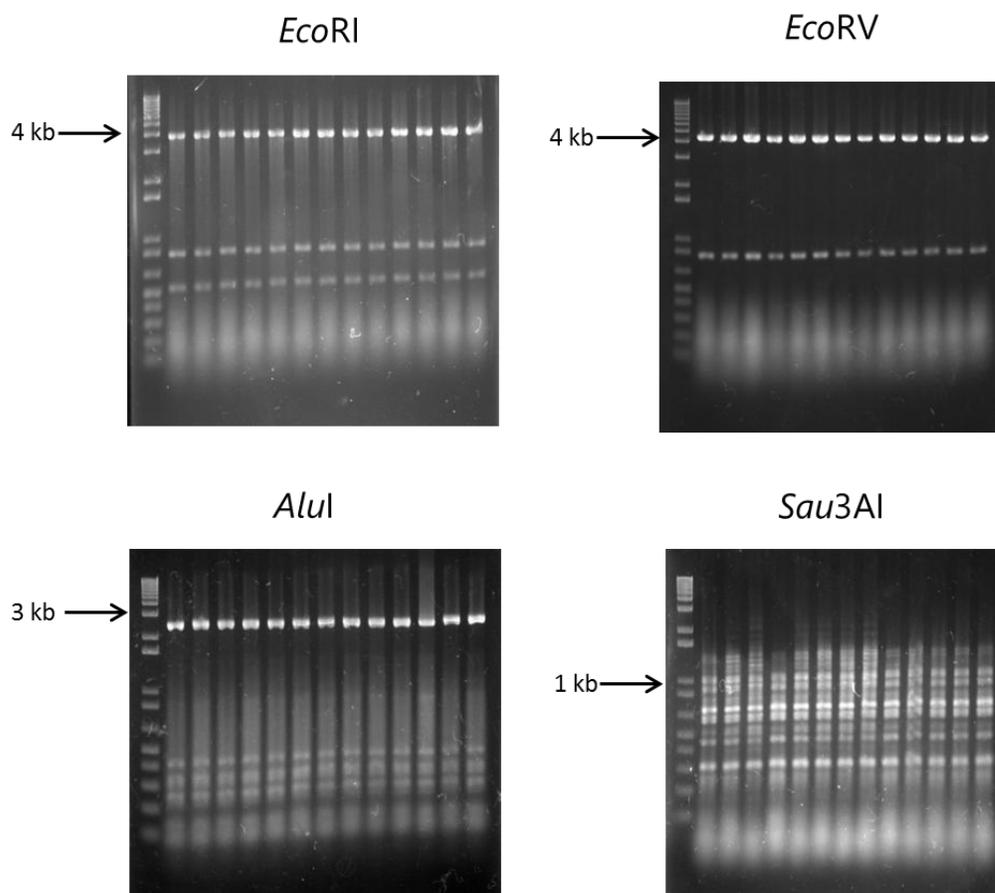


Figura 18. Análisis de restricción con las enzimas *EcoRI*, *EcoRV*, *AluI* y *Sau3AI* de clonas con los amplicones obtenidos de genes *cry*.

VII 14. Amplificación de genes *cry* completos y análisis de secuencia.

Se procedió posteriormente a la amplificación mediante PCR y secuenciación del gen *cryIAC* completo de la cepa LBIT-1200. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos mostrados en la (Tabla 10) teniendo en cuenta que los extremos 5' y 3' de estos genes son muy conservados, encontrándose las mayores variaciones en la región central.

Tabla 10. Iniciadores empleados para amplificar el gen completo *cryIAc* de la cepa LBIT-1200.

Iniciadores	Secuencia de nucleótidos	Temp °C
Cry1AcF	ATGGATAACAATCCGAACATC	52
Cry1AcR	GACTATTCCTCCATAAG	53

Se obtuvo entonces mediante PCR un amplicón de un tamaño aproximado de 3.5 kb que corresponde al gen completo *cryIAc* de nuestra cepa de interés (Figura 19). Posteriormente se procedió a secuenciar y analizar la secuencia obtenida. Se detectó que el gen contiene 3537 nucleótidos (Anexo 6) y presenta cuatro sustituciones más, además de las tres sustituciones antes mencionadas, para un total de siete sustituciones nucleotídicas, con respecto al gen *cryIAc1* tipo, y que se encuentra en la cepa HD-73. Estas sustituciones no se encuentran presentes en ninguno de los genes *cryIAc* reportados hasta la fecha. La secuencia se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso KT183532.

Posteriormente se obtuvo una predicción de la estructura terciaria de la proteína activada (de tres dominios) mediante el servidor I-TASSER donde se pudo determinar que la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200 muestra un 99 % de similitud en su estructura terciaria con respecto a la proteína Cry1Ac1 producida por la cepa HD-73. Se observaron los dominios estructurales delimitados por lazos de unión y con una configuración de α -hélices y láminas β en los dominios I y dominios II y III, respectivamente. (Figura 20 A y B).

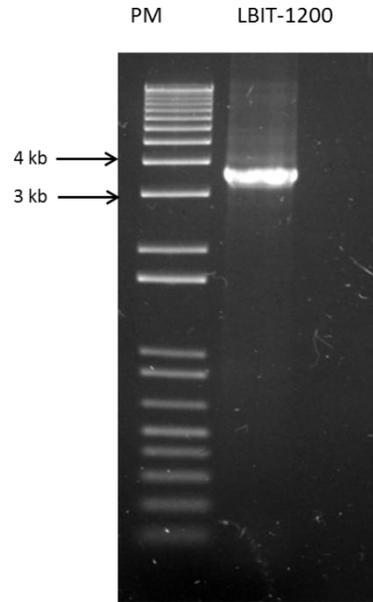


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la amplificación del gen *cryIAc* completo mediante PCR. Carril 1: Patrón de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

A Vista frontal

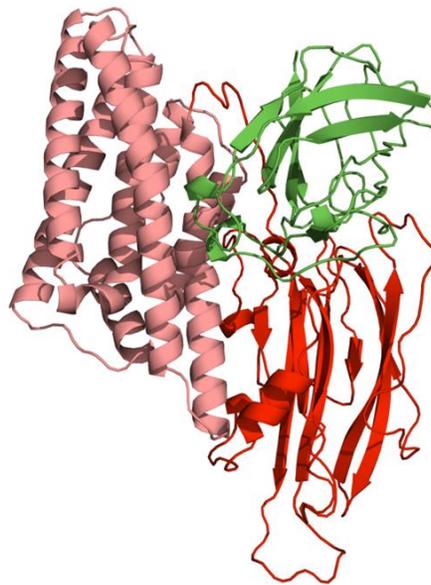


Figura 20A. Vista frontal de la estructura tridimensional predicha de la proteína Cry1Ac producida por la cepa LBIT-1200. Los dominios I, II y III se representan con los colores salmón, rojo y verde respectivamente.

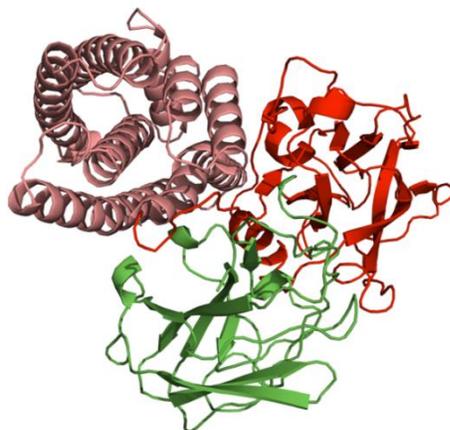
B**Vista superior**

Figura 20B. Vista superior de la estructura tridimensional predicha de la proteína Cry1Ac producida por la cepa LBIT-1200. Los dominios I, II y III se representan con los colores salmón, rojo y verde respectivamente.

Posteriormente se realizó el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ac de nuestra cepa de estudio con el resto de las proteínas Cry1Ac que existen hasta la fecha y se detectó la presencia de cuatro sustituciones de aminoácidos derivadas de algunas de las sustituciones de nucleótidos que se encontraron en la secuencia de la cepa LBIT-1200 (Anexo 7). Las sustituciones presentes fueron las siguientes: M1L, N519Y, R574G y L867F (Fig 21A-D).

Se realizó un análisis filogenético para determinar la relación entre la proteína Cry1Ac de LBIT-1200 y el resto de las proteínas Cry1Ac cuya secuencias completas se conocen (algunas proteínas Cry1Ac se encuentran reportadas como secuencias parciales) (Figura 22). Teniendo en cuenta que esta proteína no mostró un 100 % de similitud con ninguna de las proteínas empleadas en esta comparación, su secuencia se sometió a criterio del Comité de Nomenclatura de Toxinas de *B. thuringiensis* para la asignación de un número de acuerdo a los criterios de nomenclatura establecidos para las proteínas Cry, quedando registrada como Cry1Ac39.

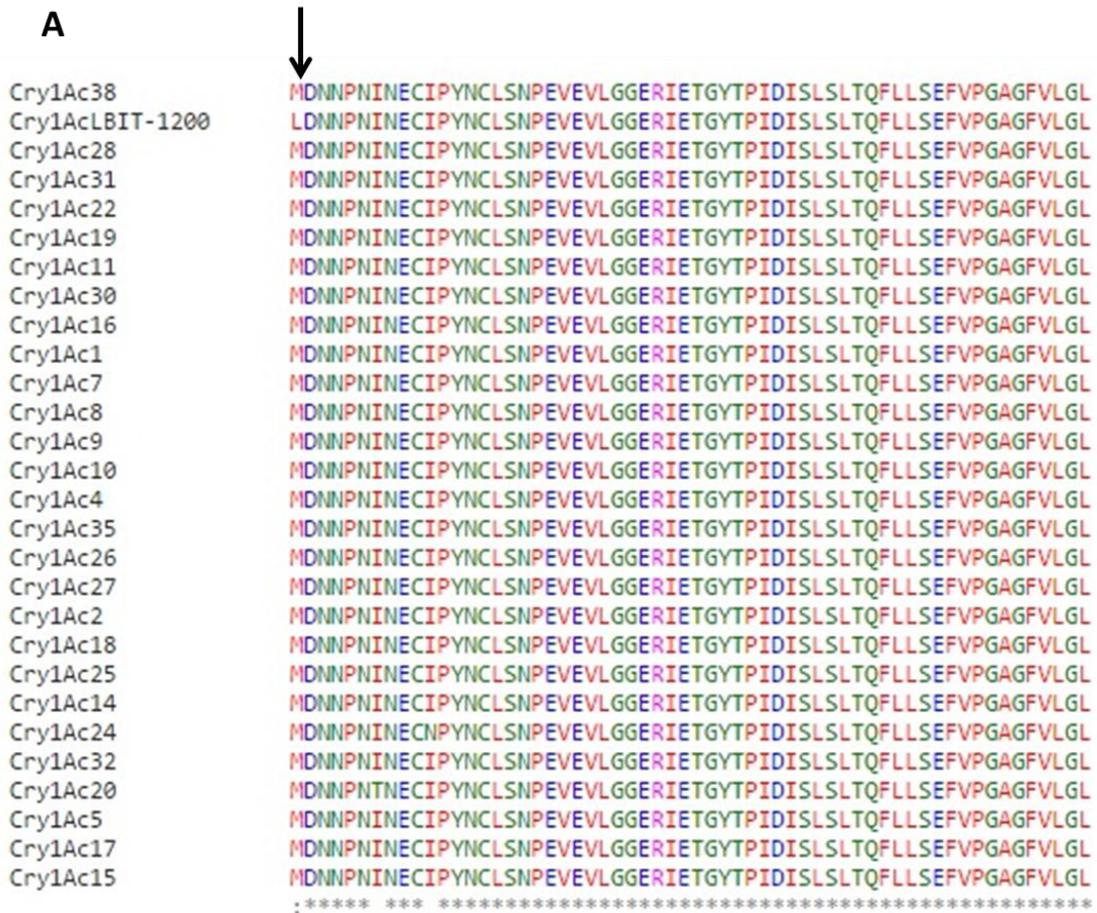


Figura 21A. Alineamiento de la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200 con todas las proteínas Cry1Ac completas conocidas hasta la fecha . Se señala con una flecha la sustitución M1L.



Figura 21B. Alineamiento de la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200 con todas las proteínas Cry1Ac completas conocidas hasta la fecha . Se señala con una flecha la sustitución N547Y.

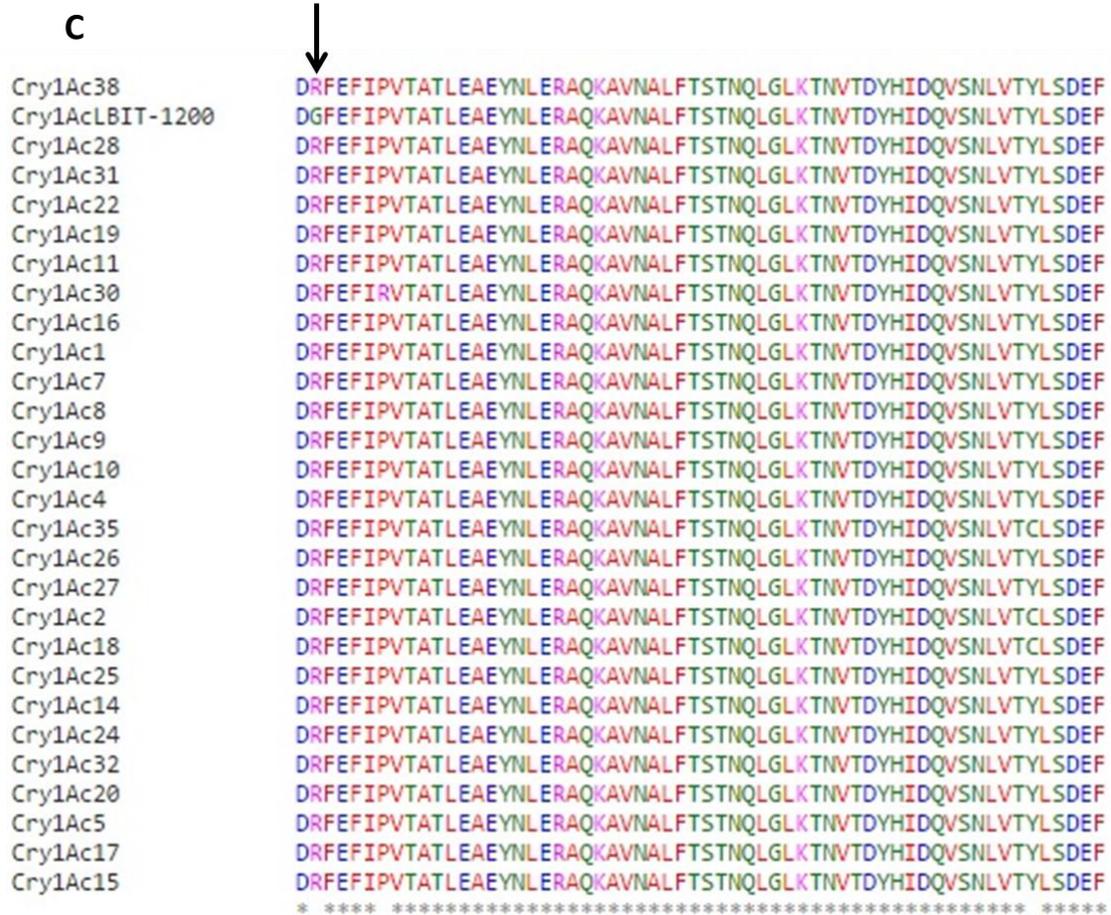


Figura 21C. Alineamiento de la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200 con todas las proteínas Cry1Ac completas conocidas hasta la fecha . Se señala con una flecha la sustitución R602G.

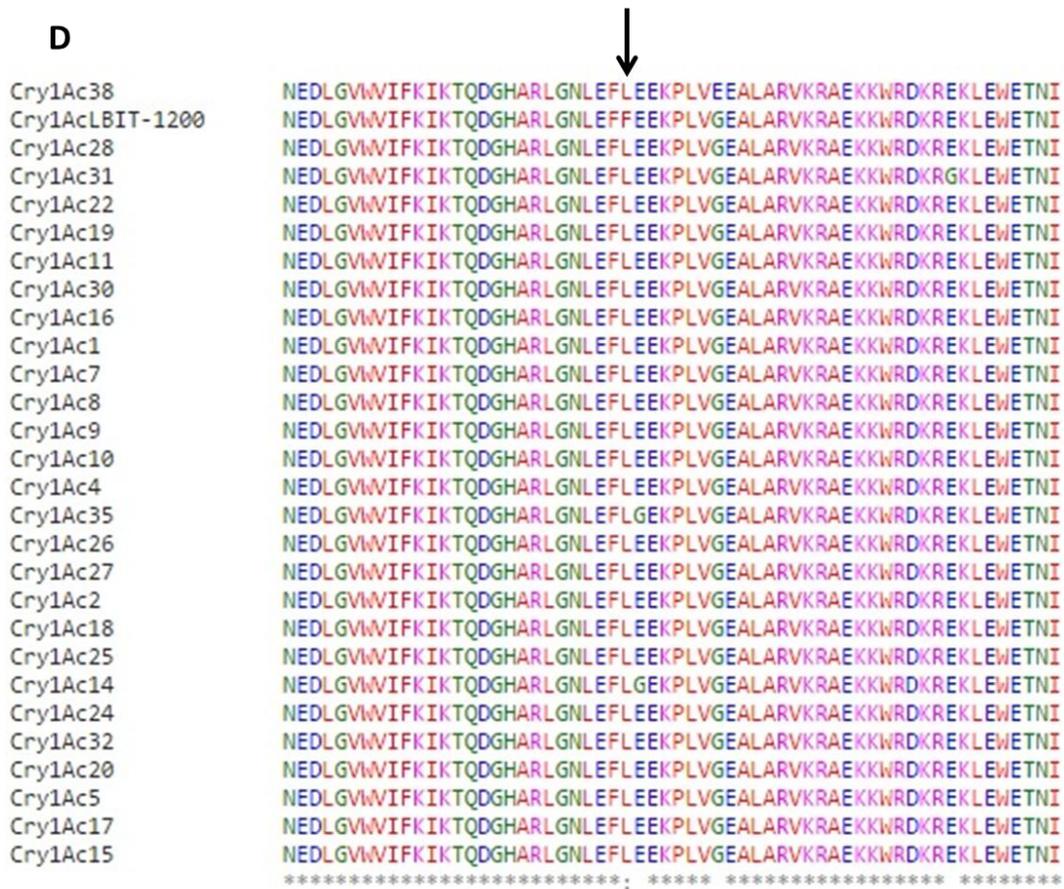


Figura 21D. Alineamiento de la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200 con todas las proteínas Cry1Ac completas conocidas hasta la fecha . Se señala con una flecha la sustitución L867F.

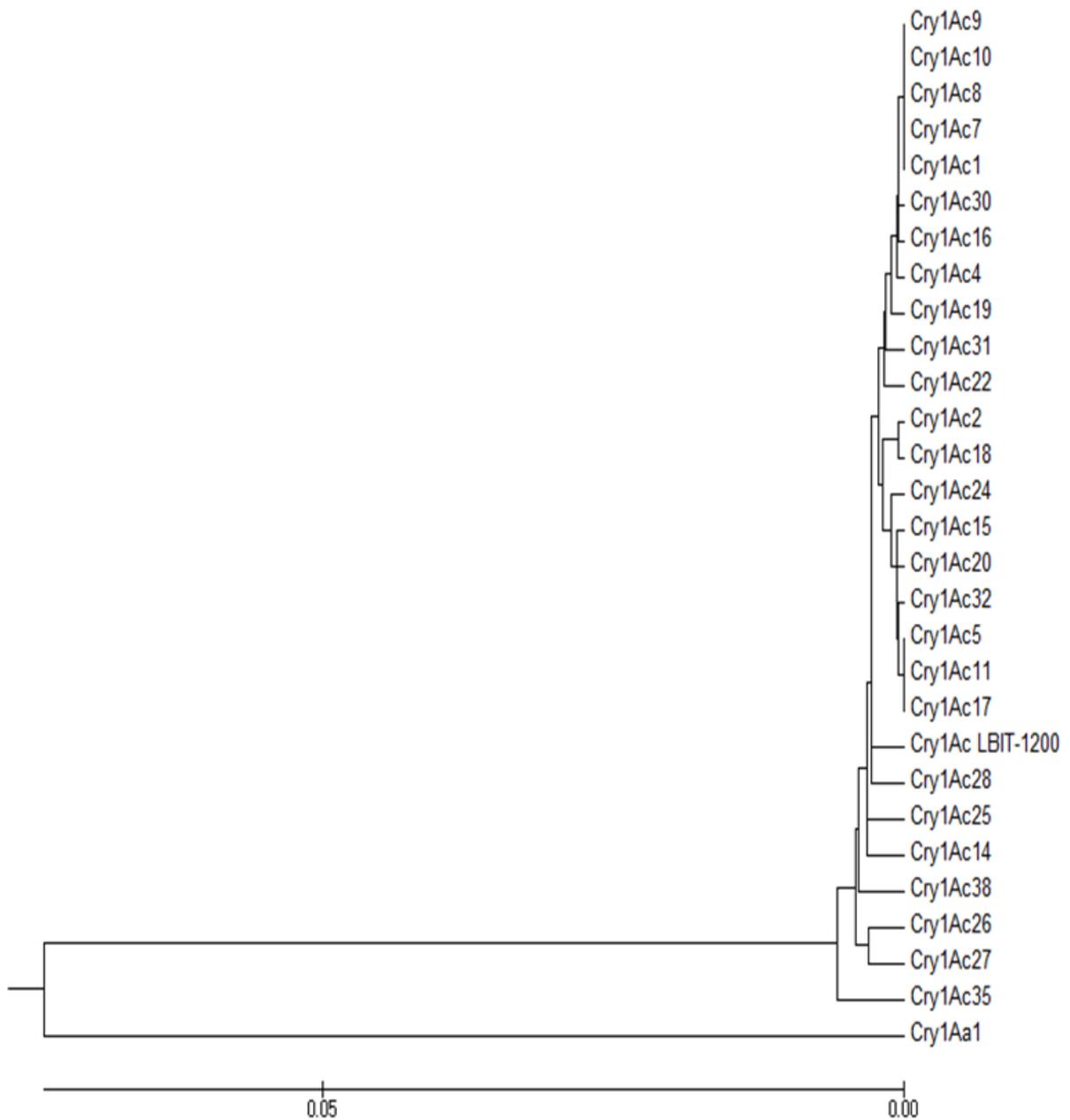


Figura 22. Árbol obtenido por análisis Neighbor-joinig donde se muestran las relaciones filogenéticas entre las diferentes proteínas Cry1Ac y la proteínas Cry1Ac de LBIT-1200 en base a la secuencia de aminoácidos de la flagelina. La proteínas Cry1Aa se empleó como “out group”

Las sustituciones M1L y L867F se encuentran en los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína, respectivamente, fuera de la región tóxica de la proteína. Mientras que las sustituciones N547Y y R602G se encuentran ubicadas en la región que constituye la toxina activa. Mediante un análisis de la estructura tridimensional de la δ -endotoxina se determinó que ambas sustituciones se encuentran en el dominio III de la δ -endotoxina. La sustitución N547Y se encuentra en un lazo expuesto hacia el exterior del dominio que une la cadena β número 19 y la cadena β número 20 del dominio III (Figura 23). Por otra parte la sustitución R602G se encuentra en el centro de la cadena β número 24 del dominio III, localizada hacia el interior de este dominio (Figura 24).

N547Y

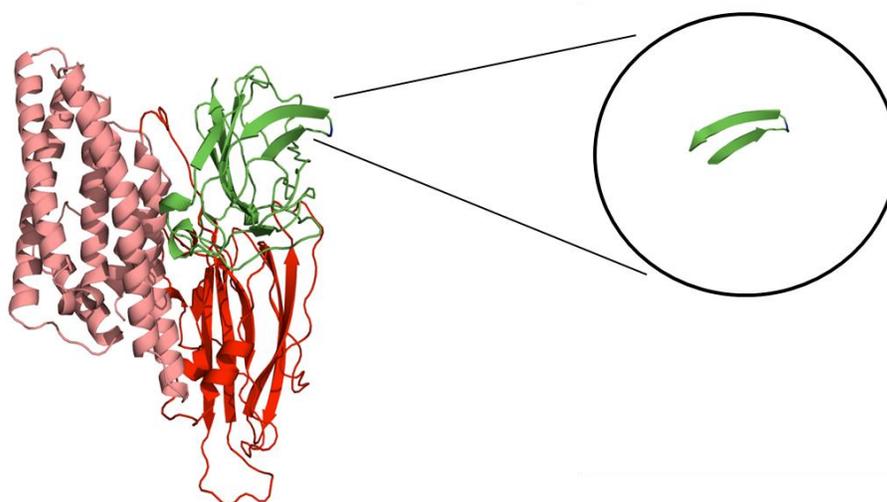


Figura 23. Estructura tridimensional predicha de la δ -endotoxina Cry1Ac de la cepa LBIT-1200. El lazo del dominio III en el que se encuentra la sustitución N547Y se resalta en color azul.

R602G

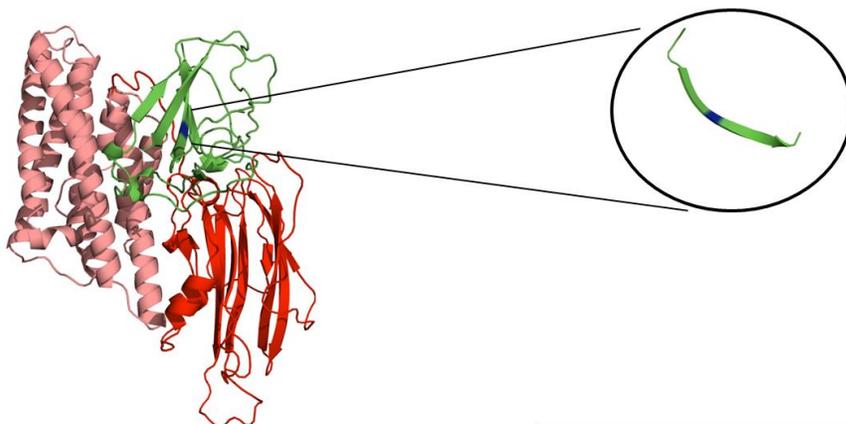


Figura 24. Estructura tridimensional predicha de la δ -endotoxina Cry1Ac de la cepa LBIT-1200. La cadena β del dominio III en la que se encuentra la sustitución R602G se resalta en color azul.

VII 15. Mutagénesis dirigida. Obtención de genes mutados mediante PCR. Expresión de proteínas mutantes en la cepa acrístalífera LBIT-601.

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente se procedió a realizar experimentos de mutagénesis dirigida con el objetivo de introducir las sustituciones de aminoácidos que presenta la región de la δ -endotoxina de la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200 (N547Y y R602G) en el la proteína Cry1Ac1 de la cepa estándar HD-73. De esta forma se puede comprobar si estas sustituciones de aminoácidos son las responsables de la alta toxicidad que presenta la cepa LBIT-1200 ante *M. sexta* y *T. ni*.

Se procedió a amplificar la secuencia completa del gen *cry1Ac1* de la cepa HD-73 empleando los iniciadores y condiciones antes mencionados. Se obtuvo un producto de PCR con un tamaño de 3.5 kb aproximadamente y acorde a lo esperado (Figura 25). El gen obtenido se ligó al vector pJET 1.2 y se transformaron en *E. coli* DH5 α (Figura 26). La construcción obtenida (pJET 1.2 + *cry1Ac1*) se empleó como DNA parental para realizar la mutagénesis por PCR empleando las condiciones e iniciadores antes mencionados. Los productos de PCR obtenidos se digirieron con la enzima *DpnI* para eliminar el DNA parental y se clonaron en *E. coli* DH5 α .

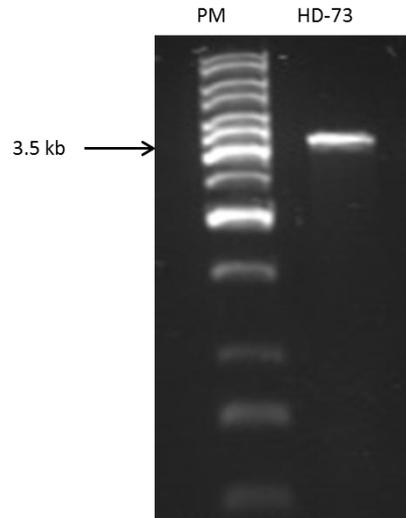


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la amplificación del gen *cryIAc1* de HD-73 mediante PCR. Carril 1: Patrón de peso molecular 1 kb (Invitrogen).

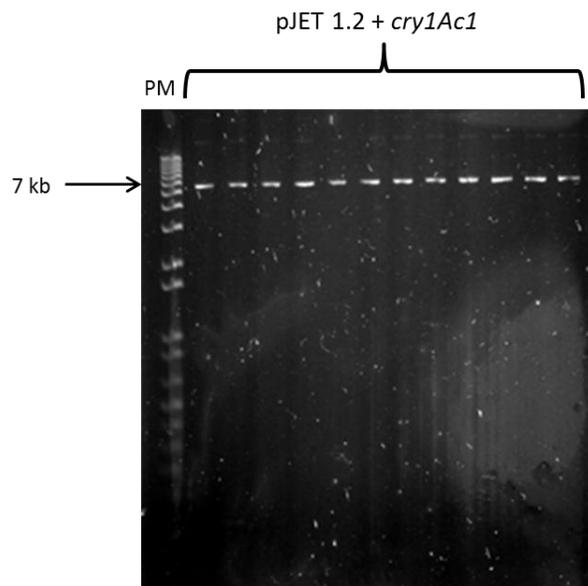


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la construcción pJET 1.2 + *cryIAc1*. Carril 1: Patrón de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

Los plásmidos obtenidos por lisis alcalina se purificaron y se enviaron 15 de cada mutación a secuenciar para corroborar la presencia de los codones mutantes introducidos en el gen *cryIAcI*. Las secuencias se analizaron con el programa SnapGene. Se obtuvieron 8 clonas positivas de 15 para la sustitución de aminoácidos N537Y y 6 clonas de 15 para la sustitución R602G (Figura 27A y B).

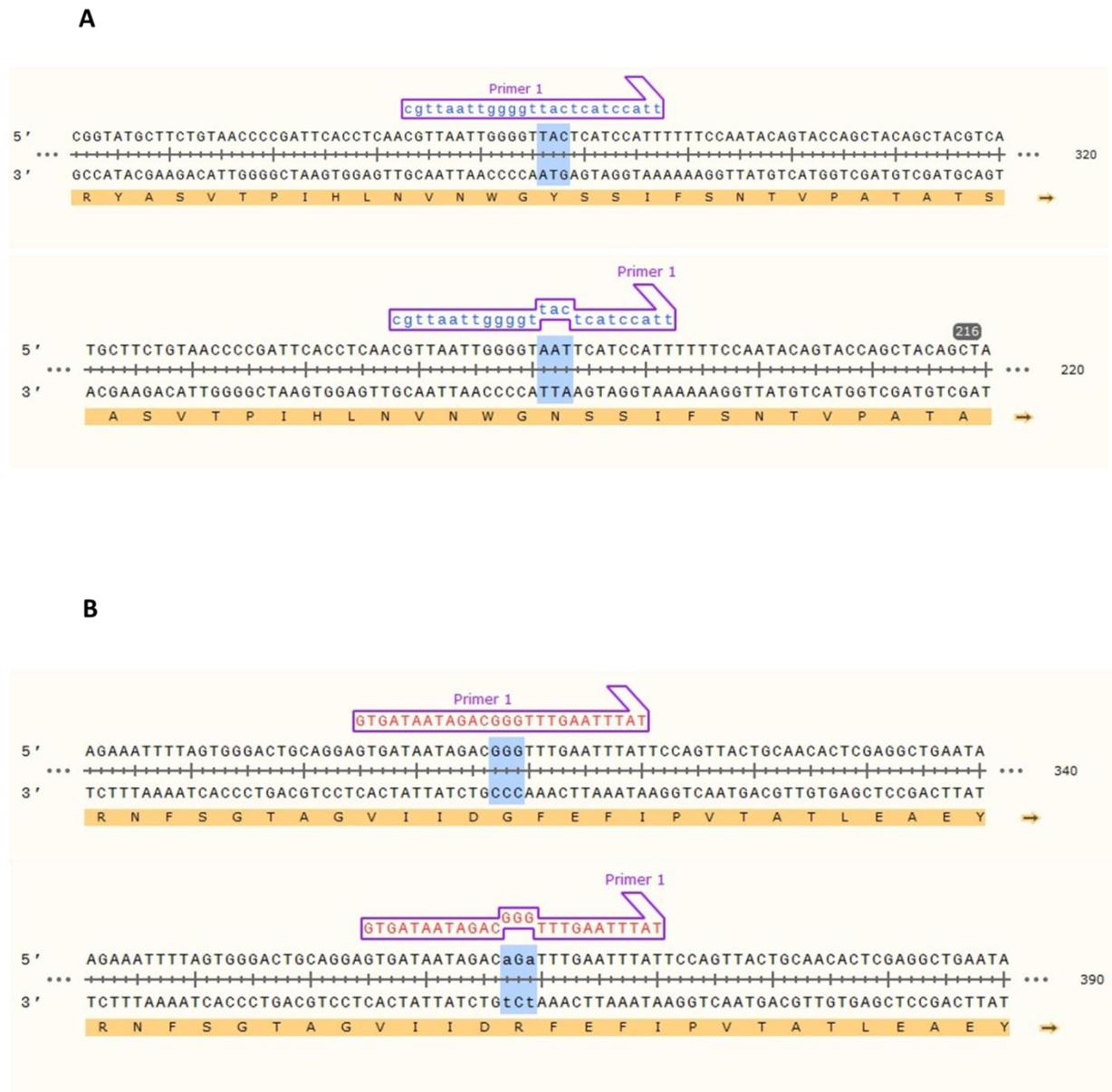


Figura 27. Análisis de secuencias para la detección de clonas mutadas en el programa SnapGene. A: clona positiva N547Y, B: clona positiva R602G. En ambos casos los genes mutados se muestran en la parte inferior de la figura.

Al obtener las clonas positivas de las dos mutaciones analizadas se generó la doble mutación empleando como DNA parental para el PCR mutagénico una de las clonas con la mutación R602G y los iniciadores para generar la mutación N547Y. Mediante este procedimiento se obtuvieron 6 clonas positivas de 15.

Una vez obtenidas las mutaciones puntuales y la doble mutante se liberó el gen *cryIAC* de cada una del vector pJET 1.2 mediante digestión con las enzimas *SphI* y *SalI* (Figura 28A) e igualmente se digirió el vector pSTAB con las mismas enzimas para su posterior ligación. Esta última construcción se corroboró mediante doble digestión con las enzimas antes mencionadas (Figura 28B) y se utilizó para transformar células de la cepa acristalífera LBIT-601 que posteriormente se liofilizaron para realizar bioensayos comparativos. Previamente, la expresión de las proteínas mutantes se confirmó mediante observación de cristales parasporales al microscopio óptico de contraste de fases.

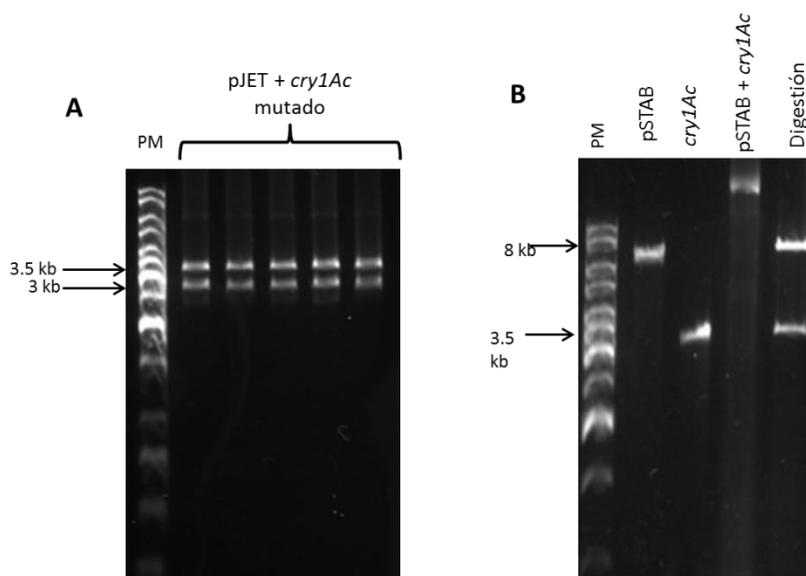


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa 1 %. A: Digestión de la construcción pJET+cryIAC. B: Ligación de los genes *cryIAC* mutados y el vector pSTAB, digestión de la construcción pSTAB+cryIAC.

VII 16. Microscopía electrónica de cepas de *B. thuringiensis* mutantes

Se analizó la morfología de los cristales formados por las cepas mutantes mediante microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa. Todos los cristales mutantes mantuvieron la morfología típica bipiramidal (Figura 29A-D). Los cristales formados por la cepa mutante R602G fueron los de mayor tamaño con 2.02 μm de longitud promedio, sin embargo, los cristales de esta cepa no mostraron diferencias significativas con respecto al tamaño de los cristales formados por la cepa mutante N547Y (1.97 μm). La doble mutante formó cristales con un tamaño promedio de 1.24 μm , muy similar a los producidos por la cepa LBIT-1200, pero se observaron diferencias significativas entre los tamaños de los cristales de la doble mutante y el resto de los tratamientos. Los cristales más chicos fueron los producidos por la cepa control que expresa la proteína Cry1Ac1 de la cepa HD-73, con un tamaño promedio de 1.11 μm de longitud,

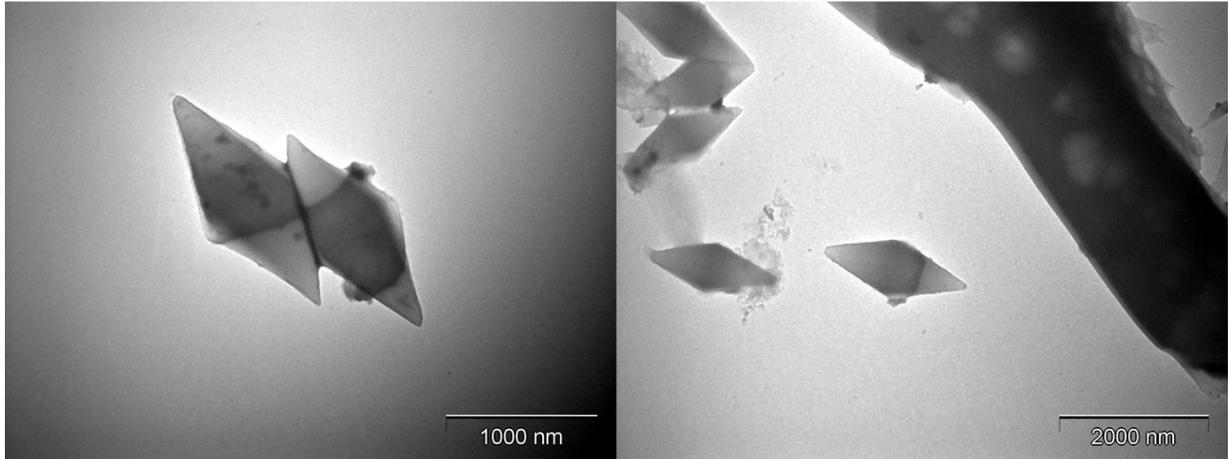
Tabla 11. Tamaño promedio de los cristales formados por las cepas mutantes

Mutante	Tamaño promedio (μm)	DES
N547Y	1.97 a	0.3
R602G	2.02 a	0.3
DM	1.24 b	0.2
Cry1Ac1	1.11 c	0.2

DES. Desviación Estándar

DM: Doble Mutante

A



B

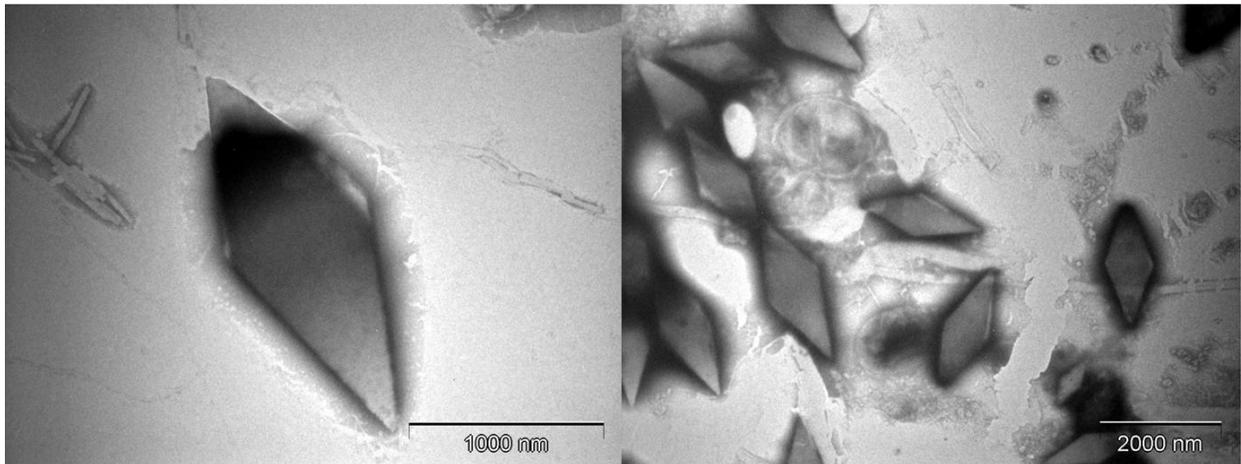
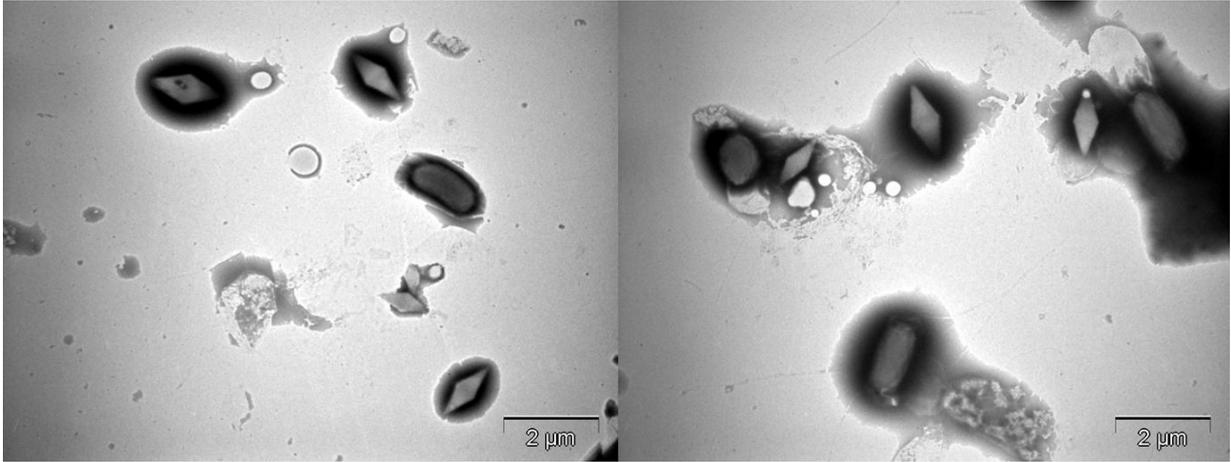


Figura 29. Análisis de la morfología de las cepas mutantes mediante tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión. A: mutante N547Y, B: mutante R602G.

C



D

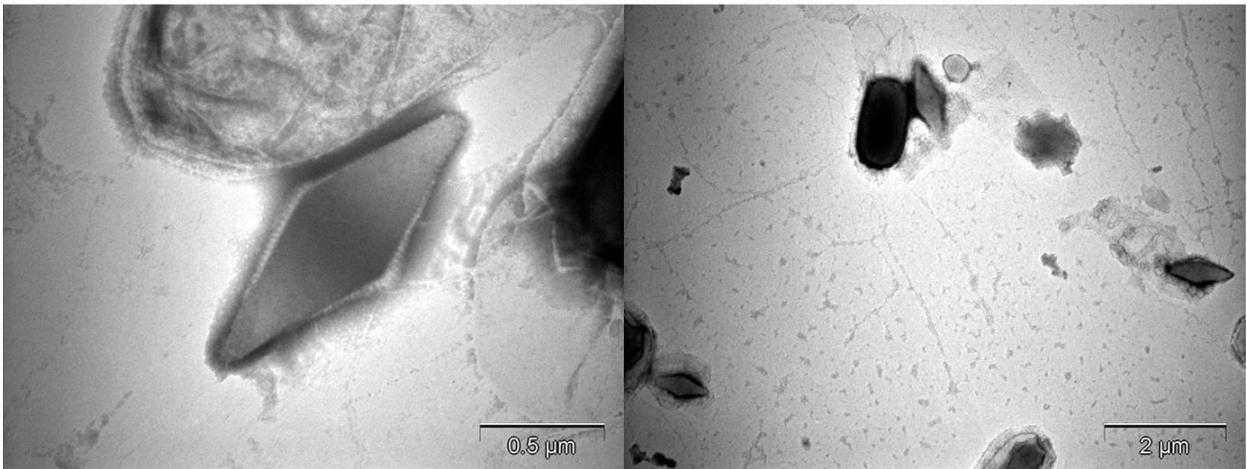


Figura 29. Análisis de la morfología de las cepas mutantes mediante tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión. C: doble mutante N547Y y R602G, D: cepa control Cry-B expresando la proteína Cry1Ac1 de la cepa estándar HD-73.

VII 17. Bioensayos para determinar la CL₅₀ de las cepas mutantes frente a *M. sexta* y *T. ni*

Se realizaron bioensayos para determinar la CL₅₀ de las cepas mutantes frente a los lepidópteros *M. sexta* y *T. ni*. Para los controles se transformó la cepa acristalífera LBIT-601 para la expresión de los genes *cryIAc* de las cepas nativas HD-73 y LBIT-1200 de forma independiente. Los bioensayos se realizaron bajo las condiciones descritas anteriormente.

En los bioensayos con *M. sexta* se observó que la cepa con la mutación N547Y tuvo un valor de CL₅₀ de 3.95 ng/cm², mientras que en la doble mutante la CL₅₀ fue de 5.27 ng/cm². Estas mutantes mostraron los valores de CL₅₀ más bajos, junto al control que expresa el gen *cryIAc* de la cepa LBIT-1200 que tuvo una CL₅₀ de 4.73 ng/cm² y no se observaron diferencias significativas entre ellas. La cepa con la mutación R602G tuvo una CL₅₀ de 9.37 ng/cm² mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos antes mencionados y con el control que expresa el gen *cryIAcI* de la cepa HD-73 cuyo valor de CL₅₀ fue de 27.2 ng/cm² (Tabla 11)

Los bioensayos con *T. ni* tuvieron resultados semejantes ya que las cepas con la mutación N547Y, la doble mutante y el control que expresa el gen *cryIAc* de LBIT-1200 mostraron una mayor toxicidad hacia este lepidóptero, con valores de CL₅₀ de 10.85 ng/cm², 14.53 ng/cm² y 14.82 ng/cm² respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre estos tratamientos. La cepa portadora de la mutación R602G, con una CL₅₀ de 41.58 mostró diferencias significativas con los tratamientos antes mencionados y con el control que expresa el gen *cryIAc* de HD-73 que tuvo un valor de CL₅₀ de 180.5 ng/cm² (Tabla 11).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estos bioensayos con cepas que expresan proteínas mutadas, podemos determinar que de las dos mutaciones introducidas tienen un papel importante en la toxicidad de las cepas analizadas, sin embargo es importante destacar que la mutación N547Y tiene un mayor contribución a la toxicidad ya que esta mutante mostró una mayor toxicidad que la mutación R602G en todos los

bioensayos. Estos resultados nos permiten confirmar que la cepa LBIT-1200 debe su alta toxicidad a estas sustituciones de aminoácidos.

Tabla 11. Concentración letal media de las cepas mutantes contra *M. sexta* y *T. ni* empleando complejo espora-cristal.

<i>M. sexta</i>				
Cepa	CL ₅₀ (ng/cm ²)	LF	χ ²	Pendiente
N547Y	3.95 a	2.93-5.31	3.40314	3.0227534
R602G	9.375 b	7.509-11.417	2.826234	2.141343
DM	5.275 a	4.403-6.24	2.9720	2.6246
Cry-B 1200	4.732 a	3.805-5.844	1.57078	1.8863
Cry-B HD73	27.246 c	22.701-32.368	6.6466	1.763086
<i>T. ni</i>				
N547Y	10.859 a	5.049-19.663	11.776414	1.83602
R602G	41.584 b	34.863-49.601	3.155981	2.559637
DM	14.532 a	10.9734-19.389	2.67430	2.573853
Cry-B 1200	14.817 a	8.905-24.654	4.608708	1.467896
Cry-B HD73	180.515 c	156.163-208.664	3.461284	3.257027

LF: Límites Fiduciales

DM: Doble mutante (N547Y y R602G)

VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la caracterización parcial de una cepa de Bt nativa de Irapuato, Guanajuato, México, aislada a partir de muestras de suelo y denominada LBIT-1200. La cepa pertenece al cepario del Laboratorio de Bioinsecticidas de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN y en experimentos previos había demostrado una alta toxicidad frente a ciertos insectos. Se determinó que la cepa corresponde al serotipo *kurstaki* mediante análisis de la secuencia de aminoácidos de la flagelina, ya que por métodos convencionales de serotipificación no se obtuvieron resultados debido a la autoaglutinación mostrada por la misma. Este fenómeno si bien es común entre cepas de Bt no afecta la capacidad insecticida de la misma así como tampoco impide la correcta serotipificación mediante métodos moleculares.

Empleando una serie de sets de iniciadores degenerados se determinó que LBIT-1200 sólo contiene un gen que es del tipo *cryIAc* que codifica para proteínas que se agrupan en cristales bipiramidales con tamaño mayor de 1 μm . Los genes *cryI* codifican proteínas con un tamaño aproximado de 130 kDa, que sufren un proceso de proteólisis durante la activación en el intestino de los insectos blanco. Estos genes son los más estudiados y abundantes, ya que hasta la fecha se reportan más de 150, descubiertos en diferentes partes del mundo (Lone *et al.*, 2013). Los genes *cryI* fueron además los primeros en ser caracterizados e introducidos en plantas transgénicas, debido a la actividad insecticida que presentan algunos de ellos contra lepidópteros. La frecuencia de estos genes en cepas de Bt es variable, sin embargo en la mayoría de los casos existe una prevalencia de genes *cryIA*, que se encuentran aproximadamente en el 50 % de las cepas que se analizan. Otros genes *cryI* son menos comunes como los *cryIH* y *cryIK*, son muy raros y se encuentran en pocas cepas (Yu *et al.*, 2015). La mayoría de las veces los genes *cryI* se encuentran en asociación con otros genes como los *cry2* (Seifinejad *et al.*, 2008).

Uno de los aspectos más singulares e interesantes de nuestra cepa de estudio LBIT-1200 es su alto grado de similitud con respecto a la cepa estándar HD-73. Ambas poseen patrones de Rep-PCR, patrones de plásmidos y patrones electroforéticos de proteínas idénticos. Además ambas cepas producen únicamente proteínas del tipo CryIAc que se

agrupan en cristales con morfología bipiramidal y no producen proteínas Vip. Este fenómeno ya había sido reportado antes en la literatura ya que a pesar de la gran diversidad de cepas y el gran número de proteínas Cry reportadas existen en la naturaleza algunas bacterias cuyo origen parece estar dado por pequeñas variaciones de otras poblaciones bacterianas. En Argentina se realizó la caracterización de una cepa de Bt muy similar a la cepa estándar HD-1. Los patrones de Rep-PCR y plásmidos de bajo peso molecular de ambas cepas eran idénticos, sin embargo la cepa de estudio no producía la proteína Cry2A y por tanto sus cristales sólo mostraban morfología bipiramidal (Sauka *et al.*, 2010). De igual manera otro grupo de investigadores realizaron el análisis de una cepa de Bt muy similar a HD-73, como ocurre en nuestro caso. Esta cepa mostraba una alta toxicidad hacia el lepidóptero *Plutella xylostella* y producía una proteína Cry1Ac22 que difiere de la proteína Cry1Ac1 en tres aminoácidos distribuidos en los dominios II, III y en la región carboxilo terminal de la proteína (Xuanjun *et al.*, 2010). Como muestran los ejemplos anteriores, las variaciones entre algunas cepas de Bt pueden ser mínimas, sin embargo unas pequeñas diferencias pueden ser suficientes para asegurar que se trata de dos microorganismos diferentes .

El género *Bacillus* es muy heterogéneo desde el punto de vista genotípico y fenotípico, sin embargo dentro del grupo *cereus* existe una gran homogeneidad. Por tanto la separación taxonómica de *B. cereus* y *B. thuringiensis* está todavía en discusión. El análisis de la secuencia del 16S rDNA ha demostrado ser uno de los métodos moleculares más efectivos como herramienta taxonómica para estimar la diversidad genética entre especies y subespecies (Joung y Côté, 2002), pero hasta la fecha no se ha podido emplear para discriminar de manera exitosa entre Bt y *B. cereus*, tal y como vemos en los resultados de nuestro trabajo. Este conflicto ya había sido reportado con anterioridad por otros autores que al realizar el análisis de la secuencia variable del gen en diferentes cepas de Bt y *B. cereus* no pudieron discriminar entre ambas especies y mucho menos entre diferentes serotipos de Bt (Bourque *et al.*, 1995). Por otro lado, actualmente se considera al gen *gyrB* como mejor candidato para la discriminación entre especies del grupo *cereus*. Este gen codifica para la enzima Topoisomerasa II, tiene un tamaño aproximado de 2 kb, se expresa de forma constitutiva y es muy conservado, además el análisis de su secuencia es muy simple y no es costosa (La Duc *et al.*, 2004). En los primeros intentos para el uso de *gyrB*

como marcador molecular para diferenciar especies del grupo *cereus* se amplificaba todo el gen completo y se realizaban digestiones con diferentes enzimas de restricción con el fin de obtener un patrón de bandas y establecer comparaciones. Mediante esta técnica se pudo diferenciar con facilidad entre *B. cereus* y *B. thuringiensis* (Jensen *et al.*, 2005). Posteriormente se sumó a este tipo de análisis el gen *aroE* que ofrece un mayor poder discriminatorio entre cepas del grupo *cereus* en comparación con el 16s rDNA, mientras que se disminuyó el número de pares de bases a analizar del gen *gyrB*. Mediante el análisis de esta región particular de *gyrB* se logró discriminar entre cepas de Bt de un mismo serotipo, de una manera rápida y certera (Soufiane y Côté, 2009). En el presente trabajo se pudo determinar que la cepa LBIT-1200 es original y no es un reaislamiento de la naturaleza de la cepa HD-73, que forma parte de algunos bioproductos que se aplican en la agricultura, ya que existen diferencias en las secuencias de los genes 16S rDNA y *gyrB* (topoisomerasa B) de ambas. Debido a las semejanzas entre ambas cepas se decidió emplear la cepa HD-73 como control en los bioensayos para determinar la CL₅₀ de LBIT-1200 para los insectos susceptibles.

La cepa LBIT-1200 no produce β -exotoxina, lo cual se determinó mediante un simple bioensayo con el nemátodo *C. elegans*. Esta toxina, por sus posibles efectos taratogénicos ha sido considerada como perjudicial para algunos vertebrados, además de su potente efecto insecticida. Por ello en algunos países se recomienda el uso de cepas de Bt no productoras de β -exotoxina en la agricultura (OMS, 1999). Aunque no se han identificado factores genéticos o ambientales específicos que contribuyan a la producción de la β -exotoxina, se ha estudiado la posible relación entre la presencia de genes *vip2*, *cryIB* y la producción de esta sustancia (Perani *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha visto que menos del 30% de las cepas de Bt con actividad contra lepidopteros y productoras de proteínas Cry con un tamaño aproximado de 130 kDa, no producen β -exotoxina o la producen en muy pequeñas cantidades (Espinasse *et al.*, 2002). El hecho de que nuestra cepa no produzca esta toxina, es un aspecto importante a tener en cuenta debido a sus perspectivas como agente de control biológico.

En los experimentos burdos realizados para determinar el espectro de actividad entomopatogena, la cepa LBIT-1200 sólo mostró toxicidad hacia los lepidopteros *M. sexta*,

T. ni y *S. frugiperda*. No se observó toxicidad hacia el resto de los organismos probados. Se determinó la concentración letal media de esta cepa para los lepidópteros susceptibles y los valores alcanzados por nuestra cepa fueron muy bajos (3.42 ng/ cm² para *M. sexta* y 11.45 ng/ cm² para *T. ni*) con respecto a la cepa estándar HD-73. Estos valores son aún más bajos que los obtenidos por las cepas de serotipo kurstaki HD-1 y SA11 que forman parte de los ingredientes activo de los bioproductos Dippel y Javelin respectivamente y que se emplean en la agricultura para el control biológico de lepidópteros. La cepa HD-1 debe su alta toxicidad a la producción conjunta de varias proteínas Cry (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa y Cry2Ab) que combinadas tiene un alto poder insecticida. Actualmente HD-1 es considerada como cepa estándar en la actividad tóxica contra lepidópteros. Estos resultados indican que LBIT-1200 puede ser considerada como cepa candidata para el desarrollo de bioinsecticidas para el control de *M. sexta* y *T. ni* teniendo en cuenta su alta toxicidad hacia los mismos.

M. sexta se ha empleado como insecto modelo en el estudio de las interacciones y modos de acción de las proteínas Cry en lepidópteros. Se ha demostrado que este insecto tiene una alta sensibilidad a las proteínas Cry en particular a las del tipo Cry1Ac (Portugal *et al.*, 2014), como la que produce nuestra cepa de estudio. Además en estudios anteriores se determinó que la toxina Cry1Ac produce una mayor mortalidad en *M. sexta* que las proteínas Cry1Aa y Cry1Ab. Esto puede deberse a la preferencia de Cry1Ac de interactuar con un receptor de tipo aminopeptidasa N que se encuentra presente en el intestino de las larvas de *M. sexta* durante todo el desarrollo larval, mientras que las otras proteínas Cry1A interactúan con otros receptores que sólo se encuentran en etapas tempranas del desarrollo larval. Cada uno de estos receptores tiene un papel distinto en el mecanismo de acción de las proteínas Cry en *M. sexta* (Flores-Escobar *et al.*, 2013; McNall y Adang, 2003). Por otra parte, *T. ni* es un lepidóptero conocido como el falso medidor de la col y provoca grandes pérdidas en hortalizas debido a sus hábitos polífagos. Al igual que *M. sexta*, *T. ni* es muy susceptible a las proteínas Cry1Ac, incluso más sensible que a las proteínas Cry1Aa, Cry1B y Cry1C, pero esta sensibilidad a Cry1Ac no es tan alta como en *M. sexta* (Iracheta *et al.*, 2000). Esto quizás pueda explicar el hecho de que las CL₅₀ de nuestra cepa para *T. ni* no sea tan baja como para *M. sexta*.

La cepa LBIT-1200 no tuvo mortalidad hacia *G. mellonella* y mostró un 100 % de mortalidad hacia *S. frugiperda* en los bioensayos burdos con altas concentraciones del complejo espора-cristal (10 µg/ml) sin embargo al disminuir esta concentración con el objetivo de determinar la CL₅₀ no se observó mortalidad alguna.

G. mellonella, conocida como la palomilla de la cera, es un lepidóptero de distribución mundial que afecta las colmenas de abejas mielíferas. Las larvas de este insecto son muy susceptibles únicamente a algunas proteínas como: Cry9A, Cry1G y Cry1C, que no son producidas por nuestra cepa de estudio LBIT-1200. Esta susceptibilidad tan específica se puede deber también al procesamiento inadecuado del resto de las proteínas Cry por parte de las proteasas alcalinas del intestino medio del insecto (Kalman *et al.*, 1993). Por tanto no resulta contradictorio que la cepa LBIT-1200 muestre una alta toxicidad hacia algunos lepidópteros mientras que resulta inofensiva para *G. mellonella*.

Nuestros resultados con *S. frugiperda* se encuentran acorde a los obtenidos previamente por otros investigadores ya que de manera general se plantea que los insectos del género *Spodoptera* tienen una baja susceptibilidad a los productos comerciales de Bt y a la mayoría de las proteínas Cry. En particular *S. frugiperda* es considerada una de las plagas más importantes debido a que afecta cultivos de importancia económica mundial como el maíz (*Zea mays*) y el algodón (*Gossypium* sp.). Se ha demostrado que las proteínas Cry1, en particular la Cry1Ac tiene poca o ninguna toxicidad hacia *S. frugiperda*. Mientras que otras proteínas como Cry1F poseen un mayor efecto tóxico e incluso se emplean para el desarrollo de cultivos transgénicos para combatir esta plaga (Jakka *et al.*, 2014). Entre las cepas más tóxicas hacia *S. frugiperda* se destacan aquellas del serotipo *aizawai* que producen además proteínas Cry1C y Cry1D que poseen en combinación una mayor mortalidad que aquellas proteínas Cry de cepas del serotipo *kurstaki* como HD-1 (Arango *et al.*, 2002). La resistencia de *S. frugiperda* a las proteínas Cry1Ac como las producidas por nuestra cepa de estudio LBIT-1200, se puede deber a una rápida degradación de las mismas en el intestino de las larvas de primer instar, dando lugar a la formación de fragmentos muy pequeños con un tamaño aproximado de 30 kDa y que por tanto no son tóxicos (Miranda *et al.*, 2001). En estudios posteriores también se demostró que la cepa estándar HD-73, que presenta aún más similitudes que HD-1 con nuestra cepa de estudio, provocó menos del 10

% de mortalidad sobre larvas de *S. frugiperda* con un valor de CL₅₀ demasiado alto en comparación con otras cepas analizadas (Luo *et al.*, 1999).

Las proteínas Vip son consideradas como una nueva generación de proteínas con actividad bioinsecticida. En los últimos años han atraído la atención de diversos grupos de investigación, y se han empleado incluso para el desarrollo de plantas transgénicas o en combinación con las proteínas Cry (Xiumei *et al.*, 2011). En el presente trabajo se pretendía detectar e identificar genes *vip* en LBIT-1200, sin embargo esta cepa no presenta genes *vip* de ninguna de las familias más conocidas y estudiadas hasta la fecha (*vip1*, *vip2* y *vip3*). Teniendo en cuenta el espectro toxicológico de LBIT-1200 sería extraño encontrar en la misma genes *vip1* o *vip2*, independientes o en combinación. Sin embargo tampoco se encontraron genes *vip3* que son comunes en algunas cepas de Bt con actividad contra lepidópteros. En estudios anteriores se realizó un análisis de cepas de Bt en busca de genes *vip* y se encontró que sólo un pequeño porcentaje de estas cepas poseía este tipo de genes, sin embargo, en otros reportes se indican resultados contradictorios encontrándose que más del 50 % de las cepas analizadas eran portadoras de genes *vip*. La abundancia de genes *vip* en un grupo de cepas de Bt puede depender de varios factores como: hábitat, condiciones ambientales y localización geográfica, sin embargo no se conoce cómo estos factores pueden estar afectando la proporción de los mismos (Moharil, 2013). Al parecer los genes *vip3* son más abundantes en cepas de Bt que los genes *vip1* y *vip2*, existiendo además una relación entre los genes *vip3* y los genes *cry1* y *cry2* e incluso con los *cry9* (Palma *et al.*, 2013; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2008). Hasta la fecha no se ha demostrado que la ausencia de genes *vip* sea un factor determinante en la toxicidad de una cepa, aunque se conoce que las proteínas Vip y Cry pueden tener efectos sinérgicos e incluso antagónicos en algunos casos (Lemes *et al.*, 2014).

Al analizar la secuencia de la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200 se detectó la presencia de 4 sustituciones de aminoácidos que no se encuentran presentes en el resto de las proteínas Cry1Ac reportadas hasta la fecha y que por tanto le acreditan un nuevo número a la misma, de acuerdo a los niveles de clasificación jerárquicos establecidos hasta la fecha por el Comité de Nomenclatura de Toxinas de Bt. La primera sustitución se encuentra en la posición MIL, las siguientes dos sustituciones se ubican en el dominio III

de la δ -endotoxina (N547Y y R602G) y la última se localiza en el extremo carboxilo terminal de la protoxina (L867F). Las δ -endotoxinas de tres dominios como Cry1ac están constituidas por tres dominios estructurales y cada uno de estos tiene un papel importante en el mecanismo de acción de las δ -endotoxinas. Por la localización de dos de estas sustituciones, se decidió realizar experimentos de mutagénesis dirigida introduciendo las mismas en la proteínas Cry1Ac de la cepa HD-73, con el objetivo de determinar si estas están relacionadas con la alta toxicidad de LBIT-1200 hacia *M. sexta* y *T. ni*. Las proteínas mutadas se expresaron en una cepa acristalífera de Bt y luego se realizaron bioensayos para determinar la CL₅₀ de las cepas mutantes con respecto a dos controles que expresaban las proteínas de las HD-73 y LBIT-1200 respectivamente. Además se analizó la morfología de los cristales proteicos formados por las cepas mutantes.

Los resultados obtenidos en los bioensayos con mutantes reflejan que si bien ambas mutaciones en conjunto producen una alta toxicidad, la mutación N547Y tiene una mayor contribución al efecto tóxico, ya que a pesar de que no se observaron diferencias significativas entre los valores de CL₅₀ de la mutante N547Y y la doble mutante, sí hubo diferencias entre los valores de la mutantes R602G con respecto a las demás.

Los experimentos de mutagénesis dirigida en proteínas Cry se emplean para la generación de variantes más tóxicas y para el estudio de la importancia de ciertos aminoácidos o regiones completas en la toxicidad y estabilidad de la misma. La mayoría de estos análisis se han enfocado en el dominio I cuya función es la formación de poros líticos en la membrana del epitelio intestinal (López-Pazos, 2010). En estudios relacionados se ha obtenido diversos resultados, tanto pérdida como aumento de la toxicidad hacia *H. armigera*, *P. xylostella*, *M. sexta* entre otros, al cambiar ciertos aminoácidos de este dominio. Asimismo se ha observado la falta de variación en la toxicidad (Hussain *et al.*, 1996). Los autores atribuyen el aumento de la toxicidad a un aumento de la formación de canales iónicos medidos mediante ensayos de voltagede tipo “clamp”.

En el caso de los experimentos de mutagénesis dirigida en los dominios II y III los resultados han sido aún más variados, ya que además de la posible disminución e incluso pérdida de la toxicidad, así como el aumento de la misma se ha observado también pérdida de la integridad estructural de la proteína (Kim *et al.*, 2016). Inicialmente se pensaba que el

dominio III de las δ -endotoxinas sólo tenía como funciones la especificidad y la interacción con receptores, sin embargo, actualmente se conoce que también participa en la estabilidad de la estructura tridimensional.

En estudios recientes se ha estudiado el papel que tienen algunos aminoácidos del dominio III localizados en los lazos más expuestos de la estructura tridimensional, en donde también se encuentra localizada una de las sustituciones de aminoácidos de la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200. En particular el aminoácido N546 de la proteína Cry1Ac5 se demostró que está involucrado directamente en la toxicidad de la cepa mediante ensayos de unión a preparaciones de BBMV (Brush Border Membrane Vesicle) de *H. armigera* (Xiang *et al.*, 2009).

En un estudio del lazo que une las láminas β 20 y 21 de la delta endotoxina Cry1ac5 se sustituyeron 10 residuos con alanina. Todas las mutantes fueron estables y formaron cristales con morfología bipiramidal y dos mutantes mostraron una mayor toxicidad hacia *H. armigera* (S581A y I585A). Se especula que este efecto se puede deber a que se favorecen fuerzas hidrofóbicas entre. Queda evidenciado que más que participar en la estabilidad de la proteína, estos lazos expuestos participan en la toxicidad de la misma (.

En otro estudio se diseñaron más de 50 mutantes y sólo una (T524N), tuvo una alta toxicidad hacia *S. exigua*, mientras que la toxicidad hacia *H. armigera* no varió. Este aminoácido se localiza también en un lazo muy expuesto que une dos láminas β (Shan *et al.*, 2011). De igual forma se estudió la importancia del aminoácido W544 mediante sustituciones con otros residuos. De todas las mutaciones realizadas, sólo una, W544F, mantuvo su toxicidad hacia *H. armigera*, produciendo además cristales de mayor tamaño. El resto de las mutantes disminuyeron su toxicidad.

Debido a la ubicación de la sustitución N547Y y los resultados antes expuestos podríamos pensar que la alta toxicidad de la cepa LBIT.1200 se debe a que este aminoácido en particular provoca una mejor interacción con los receptores específicos del intestino medio de *M. sexta* y *T. ni*. Sin embargo, algunos experimentos posteriores serían necesarios para corroborar este planteamiento.

XI. CONCLUSIONES

1. La cepa LBIT-1200 puede ser empleada de manera eficiente en el control biológico de *M. sexta* y *T. ni*. Sin embargo no será de utilidad para el control de *S. frugiperda*, *G. mellonella*, *T. molitor*, *C. elegans* y *A. aegypti*.
2. Existe gran similitud entre LBIT-1200 y la cepa estándar HD-73 en aspectos genéticos, morfológicos y bioquímicos, sin embargo se pudo determinar mediante análisis de marcadores moleculares que LBIT-1200 es una cepa original.
3. La cepa LBIT-1200 produce únicamente proteínas Cry1Ac que presentan cuatro sustituciones de aminoácidos, con respecto a las proteínas Cry1Ac conocidas hasta la fecha. La alta toxicidad de la cepa hacia *M. sexta* y *T. ni* está relacionada con dos de estas sustituciones localizadas en el dominio III de la δ -endotoxina (N547Y y R602G).
4. La cepa LBIT-1200 presenta un gran potencial para ser desarrollada biotecnológicamente, ya que mostró niveles de toxicidad entre 6 y 10 veces mayores a las cepas estándar y comercializadas.

X. REFERENCIAS

- Abdullah, M. A., O. Alzate, M. Mohammad, R. J. McNall, M. J. Adang and D. H. Dean. "Introduction of Culex Toxicity into Bacillus Thuringiensis Cry4ba by Protein Engineering." *Appl Environ Microbiol* 69, no. 9 (2003): 5343-53.
- Angus, T. A. "A Bacterial Toxin Paralysing Silkworm Larvae." *Nature* 173, no. 4403 (1954): 545-6.
- Aoki, K and Y Chigasaki. "Über Die Pathogenität Der Sog.Sotto Bacillen (Ishiwata) Bei Seidenraupen". *Mitteil. der Med. Fakult. der Kaiser Univ. zu Tokyo* 13 (1915): 419-440.
- Arango, J. A., M. Romero and S. Orduz. "Diversity of Bacillus Thuringiensis Strains from Colombia with Insecticidal Activity against Spodoptera Frugiperda (Lepidoptera:Noctuidae)." *J Appl Microbiol* 92, no. 3 (2002): 466-74.
- Argolo-Filho, R. C., R. L. Costa, D. H. Pinheiro, F. M. Correa, F. H. Valicente, A. W. Pomella and L. L. Loguercio. "Requirement of Simultaneous Assessment of Crystal- and Supernatant-Related Entomotoxic Activities of Bacillus Thuringiensis Strains for Biocontrol-Product Development." *Toxins (Basel)* 6, no. 5 (2014): 1598-614.
- Aronson, A. "Sporulation and Delta-Endotoxin Synthesis by Bacillus Thuringiensis." *Cell Mol Life Sci* 59, no. 3 (2002): 417-25.
- Atsumi, S., E. Mizuno, H. Hara, K. Nakanishi, M. Kitami, N. Miura, H. Tabunoki, A. Watanabe and R. Sato. "Location of the Bombyx Mori Aminopeptidase N Type 1 Binding Site on Bacillus Thuringiensis Cry1aa Toxin." *Appl Environ Microbiol* 71, no. 7 (2005): 3966-77.
- Awad, M. K., I. Saadaoui, S. Rouis, S. Tounsi and S. Jaoua. "Differentiation between Bacillus Thuringiensis Strains by GyrB Pcr-Sau3AI Fingerprinting." *Mol Biotechnol* 35, no. 2 (2007): 171-7.
- Bah, A., K. van Frankenhuyzen, R. Brousseau and L. Masson. "The Bacillus Thuringiensis Cry1aa Toxin: Effects of Trypsin and Chymotrypsin Site Mutations on Toxicity and Stability." *J Invertebr Pathol* 85, no. 2 (2004): 120-7.
- Barboza-Corona, J.E., J.C. Contreras, R. Velázquez-Robledo, M. Bautista-Justo, M. Gómez-Ramírez, R. Cruz-Camarillo and J.E. Ibarra. "Selection of Chitinolytic Strains of Bacillus Thuringiensis." *Biotechnology Letters* 21, no. 12 (1999): 1125-1129.
- Barjac, H. and A. Bonnefoi. "Essai De Classification Biochimique Et Sérologique De 24 Souches Debacillus Du Typeb. Thuringiensis". *Entomophaga* 7, no. 1 (1962): 5-31.
- Barth, H., K. Aktories, M. R. Popoff and B. G. Stiles. "Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common Clostridium and Bacillus Proteins." *Microbiol Mol Biol Rev* 68, no. 3 (2004): 373-402, table of contents.

- Bavykin, S. G., Y. P. Lysov, V. Zakhariyev, J. J. Kelly, J. Jackman, D. A. Stahl and A. Cherni. "Use of 16s Rrna, 23s Rrna, and Gyrb Gene Sequence Analysis to Determine Phylogenetic Relationships of Bacillus Cereus Group Microorganisms." *J Clin Microbiol* 42, no. 8 (2004): 3711-30.
- Bel, Y. and B. Escriche. "Common Genomic Structure for the Lepidoptera Cadherin-Like Genes." *Gene* 381, (2006): 71-80.
- Ben Hamadou-Charfi, D., H. Boukedi, L. Abdelkefi-Mesrati, S. Tounsi and S. Jaoua. "Agrotis Segetum Midgut Putative Receptor of Bacillus Thuringiensis Vegetative Insecticidal Protein Vip3aa16 Differs from That of CryIac Toxin." *J Invertebr Pathol* 114, no. 2 (2013): 139-43.
- Berliner, E. Ueber Die Schlafsucht Der Ephestia Kuhniiella Und Bac. Thuringiensis". *Agnew Entomol* 21-56, no. 2 (1915): 21-56.
- Bora, R. S., M. G. Murty, R. Shenbagarathai and V. Sekar. "Introduction of a Lepidopteran-Specific Insecticidal Crystal Protein Gene of Bacillus Thuringiensis Subsp. Kurstaki by Conjugal Transfer into a Bacillus Megaterium Strain That Persists in the Cotton Phyllosphere." *Appl Environ Microbiol* 60, no. 1 (1994): 214-22.
- Bourque, S. N., J. R. Valero, M. C. Lavoie and R. C. Levesque. "Comparative Analysis of the 16s to 23s Ribosomal Intergenic Spacer Sequences of Bacillus Thuringiensis Strains and Subspecies and of Closely Related Species." *Appl Environ Microbiol* 61, no. 4 (1995): 1623-6.
- Braman, J., C. Papworth and A. Greener. "Site-Directed Mutagenesis Using Double-Stranded Plasmid DNA Templates." *Methods Mol Biol* 57, (1996): 31-44.
- Bravo, A., I. Gomez, H. Porta, B. I. Garcia-Gomez, C. Rodriguez-Almazan, L. Pardo and M. Soberon. "Evolution of Bacillus Thuringiensis Cry Toxins Insecticidal Activity." *Microb Biotechnol* 6, no. 1 (2013): 17-26.
- Bravo, A., S. S. Gill and M. Soberon. "Mode of Action of Bacillus Thuringiensis Cry and Cyt Toxins and Their Potential for Insect Control." *Toxicon* 49, no. 4 (2007): 423-35.
- Butko, P. "Cytolytic Toxin Cyt1a and Its Mechanism of Membrane Damage: Data and Hypotheses." *Appl Environ Microbiol* 69, no. 5 (2003): 2415-22.
- Carrigan, P. E., P. Ballar and S. Tuzmen. "Site-Directed Mutagenesis." *Methods Mol Biol* 700, (2011): 107-24.
- Chakroun, M., N. Banyuls, Y. Bel, B. Escriche and J. Ferre. "Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria." *Microbiol Mol Biol Rev* 80, no. 2 (2016): 329-50.
- Crickmore, N. "Beyond the Spore--Past and Future Developments of Bacillus Thuringiensis as a Biopesticide." *J Appl Microbiol* 101, no. 3 (2006): 616-9.

- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D. H. Dean. "Revision of the Nomenclature for the Bacillus Thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins." *Microbiol Mol Biol Rev* 62, no. 3 (1998): 807-13.
- Dammak, I., M. Dammak and S. Tounsi. "Histopathological and Combinatorial Effects of the Metalloprotease Inha1 and Cry Proteins of Bacillus Thuringiensis against Spodoptera Littoralis." *Int J Biol Macromol* 81, (2015): 759-62.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore and H. E. Schnepf. "Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria." *Annu Rev Genet* 37, (2003): 409-33.
- de Maagd, R. A., M. S. Kwa, H. van der Klei, T. Yamamoto, B. Schipper, J. M. Vlak, W. J. Stiekema and D. Bosch. "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, no. 5 (1996): 1537-43.
- de Rijk, T. C., R. C. van Dam, P. Zomer, E. A. Boers, P. de Waard and H. G. Mol. "Development and Validation of a Confirmative Lc-Ms/Ms Method for the Determination of Ss-Exotoxin Thuringiensin in Plant Protection Products and Selected Greenhouse Crops." *Anal Bioanal Chem* 405, no. 5 (2013): 1631-9.
- Deist, B. R., M. A. Rausch, M. T. Fernandez-Luna, M. J. Adang and B. C. Bonning. "Bt Toxin Modification for Enhanced Efficacy." *Toxins (Basel)* 6, no. 10 (2014): 3005-27.
- Denolf, P., K. Hendrickx, J. Van Damme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele and J. Van Rie. "Cloning and Characterization of Manduca Sexta and Plutella Xylostella Midgut Aminopeptidase N Enzymes Related to Bacillus Thuringiensis Toxin-Binding Proteins." *Eur J Biochem* 248, no. 3 (1997): 748-61.
- Donovan, W. P., J. C. Donovan and J. T. Engleman. "Gene Knockout Demonstrates That Vip3a Contributes to the Pathogenesis of Bacillus Thuringiensis toward Agrotis Ipsilon and Spodoptera Exigua." *J Invertebr Pathol* 78, no. 1 (2001): 45-51.
- Donovan, W. P., J. T. Engleman, J. C. Donovan, J. A. Baum, G. J. Bunkers, D. J. Chi, W. P. Clinton, L. English, G. R. Heck, O. M. Ilagan, K. C. Krasomil-Osterfeld, J. W. Pitkin, J. K. Roberts and M. R. Walters. "Discovery and Characterization of Sip1a: A Novel Secreted Protein from Bacillus Thuringiensis with Activity against Coleopteran Larvae." *Appl Microbiol Biotechnol* 72, no. 4 (2006): 713-9.
- Dubois, T., K. Faegri, S. Perchat, C. Lemy, C. Buisson, C. Nielsen-LeRoux, M. Gohar, P. Jacques, N. Ramarao, A. B. Kolsto and D. Lereclus. "Necrotrophism Is a Quorum-Sensing-Regulated Lifestyle in Bacillus Thuringiensis." *PLoS Pathog* 8, no. 4 (2012): e1002629.
- Earp, D. J. and D. J. Ellar. "Bacillus Thuringiensis Var. Morrisoni Strain Pg14: Nucleotide Sequence of a Gene Encoding a 27kda Crystal Protein." *Nucleic Acids Res* 15, no. 8 (1987): 3619.

- Elleuch, J., S. Jaoua, C. Ginibre, F. Chandre, S. Tounsi and R. Z. Zghal. "Toxin Stability Improvement and Toxicity Increase against Dipteran and Lepidopteran Larvae of *Bacillus Thuringiensis* Crystal Protein Cry2aa." *Pest Manag Sci*, (2016).
- Espinasse, S., M. Gohar, D. Lereclus and V. Sanchis. "An *Abc* Transporter from *Bacillus Thuringiensis* Is Essential for Beta-Exotoxin I Production." *J Bacteriol* 184, no. 21 (2002): 5848-54.
- Espinasse, S., M. Gohar, J. Chaufaux, C. Buisson, S. Perchat and V. Sanchis. "Correspondence of High Levels of Beta-Exotoxin I and the Presence of Cry1b in *Bacillus Thuringiensis*." *Appl Environ Microbiol* 68, no. 9 (2002): 4182-6.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig and M. G. Koziel. "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, no. 11 (1996): 5389-94.
- Fang, S., L. Wang, W. Guo, X. Zhang, D. Peng, C. Luo, Z. Yu and M. Sun. "Bacillus Thuringiensis Bel Protein Enhances the Toxicity of Cry1ac Protein to *Helicoverpa Armigera* Larvae by Degrading Insect Intestinal Mucin." *Appl Environ Microbiol* 75, no. 16 (2009): 5237-43.
- Farkaš, J., K. Šebesta, K. Horská, Z. Samek, L. Dolejš, and F. Šorm. "The Structure Of Exotoxin Of *Bacillus Thuringiensis* Var. *Gelechiae*. Preliminary Communication". *Collect. Czech. Chem. Commun.* 34, no. 3 (1969): 1118-1120.
- Fedhila, S., M. Gohar, L. Slamti, P. Nel and D. Lereclus. "The *Bacillus Thuringiensis* PlcR-Regulated Gene *Inha2* Is Necessary, but Not Sufficient, for Virulence." *J Bacteriol* 185, no. 9 (2003): 2820-5.
- Fedhila, S., P. Nel and D. Lereclus. "The *Inha2* Metalloprotease of *Bacillus Thuringiensis* Strain 407 Is Required for Pathogenicity in Insects Infected Via the Oral Route." *J Bacteriol* 184, no. 12 (2002): 3296-304.
- Flores-Escobar, B., H. Rodriguez-Magadan, A. Bravo, M. Soberon and I. Gomez. "Differential Role of *Manduca Sexta* Aminopeptidase-N and Alkaline Phosphatase in the Mode of Action of Cry1aa, Cry1ab, and Cry1ac Toxins from *Bacillus Thuringiensis*." *Appl Environ Microbiol* 79, no. 15 (2013): 4543-50.
- Franco-Rivera, A., G. Benintende, J. Cozzi, V. M. Baizabal-Aguirre, J. J. Valdez-Alarcon and J. E. Lopez-Meza. "Molecular Characterization of *Bacillus Thuringiensis* Strains from Argentina." *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, no. 1 (2004): 87-92.
- Garcia, K., J. E. Ibarra, A. Bravo, J. Diaz, D. Gutierrez, P. V. Torres and P. Gomez de Leon. "Variability of *Bacillus Thuringiensis* Strains by *ERIC-PCR* and Biofilm Formation." *Curr Microbiol* 70, no. 1 (2015): 10-8.
- Guevara, Oscar Enrique, Gemma Armengol, and Neil Crickmore. "Expresión De La Toxina Cry11aa De *Bacillus Thuringiensis* Serovar. *Israelensis* En *Asticcacaulis Excentricus*, Para

- El Control De Larvas Acuáticas De Dípteros De La Familia Culicidae, Vectores De Enfermedades". *Revista Colombiana de Biotecnología* VI, no. 1 (2004): 24-30.
- Hannay, C. L. and P. Fitz-James. "THE PROTEIN CRYSTALS OF BACILLUS THURINGIENSIS BERLINER". *Can. J. Microbiol.* 1, no. 8 (1955): 694-710.
- Harry, Pilz Júnior. "Thuringiensin: A Toxin From *Bacillus Thuringiensis*. *Bt Research* (2015).
- Heimpel, A. M. "A Critical Review of *Bacillus Thuringiensis* Var. *Thuringiensis* Berliner and Other Crystalliferous Bacteria." *Annu Rev Entomol* 12, (1967): 287-322.
- Hernandez, C. S., C. Martinez, M. Porcar, P. Caballero and J. Ferre. "Correlation between Serovars of *Bacillus Thuringiensis* and Type I Beta-Exotoxin Production." *J Invertebr Pathol* 82, no. 1 (2003): 57-62.
- Hernandez-Rodriguez, C. S., A. Boets, J. Van Rie and J. Ferre. "Screening and Identification of Vip Genes in *Bacillus Thuringiensis* Strains." *J Appl Microbiol* 107, no. 1 (2009): 219-25.
- Hofte, H. and H. R. Whiteley. "Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus Thuringiensis*." *Microbiol Rev* 53, no. 2 (1989): 242-55.
- Husz, B. "*Bacillus Thuringiensis* Berl., A Bacterium Pathogenic To Corn Borer Larvae. A Preliminary Report.". *Internat. Corn Borer Invest. Sci. Rep* 1927, no. 28 (1928): 191-193.
- Iracheta, M. M., B. Pereyra-Alferez, L. Galan-Wong and J. Ferre. "Screening for *Bacillus Thuringiensis* Crystal Proteins Active against the Cabbage Looper, *Trichoplusia Ni*." *J Invertebr Pathol* 76, no. 1 (2000): 70-5.
- Jakka, S. R., V. R. Knight and J. L. Jurat-Fuentes. "*Spodoptera Frugiperda* (J.E. Smith) with Field-Evolved Resistance to Bt Maize Are Susceptible to Bt Pesticides." *J Invertebr Pathol* 122, (2014): 52-4.
- Jensen, G. B., N. Fisker, T. Sparso and L. Andrup. "The Possibility of Discriminating within the *Bacillus Cereus* Group Using GyrB Sequencing and Pcr-Rflp." *Int J Food Microbiol* 104, no. 1 (2005): 113-20.
- Jing-Wen, Zhou, Chang Ya-Fei, Xu Zheng-Hong, Yu Zi-Niu, and Chen Shou-Wen. "Production Of Thuringiensin By Fed-Batch Culture Of *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Darmstadiensis* 032 With An Improved Ph-Control Glucose Feeding Strategy". *Process Biochemistry* 42, no. 1 (2007): 52-56.
- Jolley, K. A., M. S. Chan and M. C. Maiden. "Mlstdbnet - Distributed Multi-Locus Sequence Typing (Mlst) Databases." *BMC Bioinformatics* 5, (2004): 86.
- Joung, K. B. and J. C. Cote. "A Single Phylogenetic Analysis of *Bacillus Thuringiensis* Strains and *Bacilli* Species Inferred from 16s Rrna Gene Restriction Fragment Length Polymorphism Is Congruent with Two Independent Phylogenetic Analyses." *J Appl Microbiol* 93, no. 6 (2002): 1075-82.

- Joung, K. B., S. P. Lemaire and J. C. Cote. "Genetic Diversity of *Bacillus Thuringiensis* Serovars Revealed by Rflp Using Random DNA Probes." *J Basic Microbiol* 41, no. 2 (2001): 85-95.
- Kalman, S., K. L. Kiehne, J. L. Libs and T. Yamamoto. "Cloning of a Novel Cryic-Type Gene from a Strain of *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Galleriae*." *Appl Environ Microbiol* 59, no. 4 (1993): 1131-7.
- Kalman, S., K. L. Kiehne, N. Cooper, M. S. Reynoso and T. Yamamoto. "Enhanced Production of Insecticidal Proteins in *Bacillus Thuringiensis* Strains Carrying an Additional Crystal Protein Gene in Their Chromosomes." *Appl Environ Microbiol* 61, no. 8 (1995): 3063-8.
- Kim, Jong Hoon, Song Eun Kim, Jae Young Choi, Qin Liu, Seok Hee Lee, Ying Fang, Kyu Baik Ha, Dong Hwan Park, Woo Jin Kim, and Yeon Ho Je. "Improved Insecticidal Activities Of Novel *Bacillus Thuringiensis* Cry1-Type Genes". *Journal of Asia-Pacific Entomology* 19, no. 1 (2016): 145-151.
- Knowles, B. H., P. J. White, C. N. Nicholls and D. J. Ellar. "A Broad-Spectrum Cytolytic Toxin from *Bacillus Thuringiensis* Var. *Kyushuensis*." *Proc Biol Sci* 248, no. 1321 (1992): 1-7.
- Knowles, Barbara H. and David J. Ellar. "Colloid-Osmotic Lysis Is A General Feature Of The Mechanism Of Action Of *Bacillus Thuringiensis* Δ -Endotoxins With Different Insect Specificity". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 924, no. 3 (1987): 509-518.
- Krieg, A., A. M. Huger, G. A. Langenbruch, and W. Schnetter. "*Bacillus Thuringiensis* Var. *Tenebrionis*: Ein Neuer, Gegenüber Larven Von Coleopteren Wirksamer Pathotyp". *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 96, no. 1-5 (2009): 500-508.
- La Duc, M. T., M. Satomi, N. Agata and K. Venkateswaran. "GyrB as a Phylogenetic Discriminator for Members of the *Bacillus Anthracis-Cereus-Thuringiensis* Group." *J Microbiol Methods* 56, no. 3 (2004): 383-94.
- Landt, O., H. P. Grunert and U. Hahn. "A General Method for Rapid Site-Directed Mutagenesis Using the Polymerase Chain Reaction." *Gene* 96, no. 1 (1990): 125-8.
- Laurent, P., H. Ripouteau, V. C. Dumanoir, E. Frachon and M. M. Lecadet. "A Micromethod for Serotyping *Bacillus Thuringiensis*." *Lett Appl Microbiol* 22, no. 4 (1996): 259-61.
- Lecadet, M. M., E. Frachon, V. C. Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent and I. Thiery. "Updating the H-Antigen Classification of *Bacillus Thuringiensis*." *J Appl Microbiol* 86, no. 4 (1999): 660-72.
- Lecadet, M. M., J. Chaufaux, J. Ribier and D. Lereclus. "Construction of Novel *Bacillus Thuringiensis* Strains with Different Insecticidal Activities by Transduction and Transformation." *Appl Environ Microbiol* 58, no. 3 (1992): 840-9.

- Lee, L., D. Saxena and G. Stotzky. "Activity of Free and Clay-Bound Insecticidal Proteins from *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Israelensis* against the Mosquito *Culex Pipiens*." *Appl Environ Microbiol* 69, no. 7 (2003): 4111-5.
- Lemes, A. R., C. C. Davolos, P. C. Legori, O. A. Fernandes, J. Ferre, M. V. Lemos and J. A. Desiderio. "Synergism and Antagonism between *Bacillus Thuringiensis* Vip3a and Cry1 Proteins in *Heliothis Virescens*, *Diatraea Saccharalis* and *Spodoptera Frugiperda*." *PLoS One* 9, no. 9 (2014): e107196.
- Lemes, Ana Rita Nunes, Camila Chiaradia Davolos, Paula Cristina Brunini Crialessi Legori, Odair Aparecido Fernandes, Juan Ferré, Manoel Victor Franco Lemos, and Janete Aparecida Desiderio. "Synergism and Antagonism between *Bacillus Thuringiensis* Vip3A and Cry1 Proteins in *Heliothis Virescens*, *Diatraea Saccharalis* and *Spodoptera Frugiperda*." *PLoS ONE* 9, no. 10 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0107196.
- Leuber, M., F. Orlik, B. Schiffler, A. Sickmann and R. Benz. "Vegetative Insecticidal Protein (Vip1ac) of *Bacillus Thuringiensis* Hd201: Evidence for Oligomer and Channel Formation." *Biochemistry* 45, no. 1 (2006): 283-8.
- Levinson, B. L., K. J. Kasyan, S. S. Chiu, T. C. Currier and J. M. Gonzalez, Jr. "Identification of Beta-Exotoxin Production, Plasmids Encoding Beta-Exotoxin, and a New Exotoxin in *Bacillus Thuringiensis* by Using High-Performance Liquid Chromatography." *J Bacteriol* 172, no. 6 (1990): 3172-9.
- Likitvivanavong, S., J. Chen, A. Bravo, M. Soberon and S. S. Gill. "Cadherin, Alkaline Phosphatase, and Aminopeptidase N as Receptors of Cry11ba Toxin from *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Jegathesan* in *Aedes Aegypti*." *Appl Environ Microbiol* 77, no. 1 (2011): 24-31.
- Liu, X. S. and D. H. Dean. "Redesigning *Bacillus Thuringiensis* Cry1aa Toxin into a Mosquito Toxin." *Protein Eng Des Sel* 19, no. 3 (2006): 107-11.
- Liu, X. Y., L. F. Ruan, Z. F. Hu, D. H. Peng, S. Y. Cao, Z. N. Yu, Y. Liu, J. S. Zheng and M. Sun. "Genome-Wide Screening Reveals the Genetic Determinants of an Antibiotic Insecticide in *Bacillus Thuringiensis*." *J Biol Chem* 285, no. 50 (2010): 39191-200.
- Liu, X., L. Ruan, D. Peng, L. Li, M. Sun and Z. Yu. "Thuringiensin: A Thermostable Secondary Metabolite from *Bacillus Thuringiensis* with Insecticidal Activity against a Wide Range of Insects." *Toxins (Basel)* 6, no. 8 (2014): 2229-38.
- Lone, Reyaz Ahmad, Tariq Ahmad Lone, G. Ranandkumar Sharma, S. Govindaraju, and P. Indra Arulselvi. "Cry1 Holotype Toxins Of *Bacillus Thuringiensis*". *Journal of Pharmacy Research* 6, no. 4 (2013): 481-487.
- Lopez-Pazos, S. A., A. C. Rojas Arias, S. A. Ospina and J. Ceron. "Activity of *Bacillus Thuringiensis* Hybrid Protein against a Lepidopteran and a Coleopteran Pest." *FEMS Microbiol Lett* 302, no. 2 (2010): 93-8.

- Luo, K., D. Banks and M. J. Adang. "Toxicity, Binding, and Permeability Analyses of Four *Bacillus Thuringiensis* Cry1 Delta-Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Spodoptera Exigua* and *Spodoptera Frugiperda*." *Appl Environ Microbiol* 65, no. 2 (1999): 457-64.
- Luo, X., L. Chen, Q. Huang, J. Zheng, W. Zhou, D. Peng, L. Ruan and M. Sun. "*Bacillus Thuringiensis* Metalloproteinase Bmp1 Functions as a Nematicidal Virulence Factor." *Appl Environ Microbiol* 79, no. 2 (2013): 460-8.
- Lv, Y., Y. Tang, Y. Zhang, L. Xia, F. Wang, X. Ding, S. Yi, W. Li and J. Yin. "The Role of Beta20-Beta21 Loop Structure in Insecticidal Activity of Cry1ac Toxin from *Bacillus Thuringiensis*." *Curr Microbiol* 62, no. 2 (2011): 665-70.
- Mac Innes, T. C. and G. Bouwer. "An Improved Bioassay for the Detection of *Bacillus Thuringiensis* Beta-Exotoxin." *J Invertebr Pathol* 101, no. 2 (2009): 137-9.
- Maher Obeidat,. "Toxicity Of *Bacillus Thuringiensis* D-Exotoxins And B-Endotoxins To *Drosophila Melanogaster*, *Ephestia Kuhnii* And Human Erythrocytes". *Afr. J. Biotechnol.* 11, no. 46 (2012).
- Manceva, S. D., M. Puztai-Carey, P. S. Russo and P. Butko. "A Detergent-Like Mechanism of Action of the Cytolytic Toxin Cyt1a from *Bacillus Thuringiensis* Var. *Israelensis*." *Biochemistry* 44, no. 2 (2005): 589-97.
- Marchler-Bauer, A., S. Lu, J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, M. V. Omelchenko, C. L. Robertson, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang, C. Zheng and S. H. Bryant. "Cdd: A Conserved Domain Database for the Functional Annotation of Proteins." *Nucleic Acids Res* 39, no. Database issue (2011): D225-9.
- Mc, Connell E. and A. G. Richards. "The Production by *Bacillus Thuringiensis* Berliner of a Heat-Stable Substance Toxic for Insects." *Can J Microbiol* 5, no. 2 (1959): 161-8.
- McNall, R. J. and M. J. Adang. "Identification of Novel *Bacillus Thuringiensis* Cry1ac Binding Proteins in *Manduca Sexta* Midgut through Proteomic Analysis." *Insect Biochem Mol Biol* 33, no. 10 (2003): 999-1010.
- Mesrati, L. A., S. Tounsi and S. Jaoua. "Characterization of a Novel Vip3-Type Gene from *Bacillus Thuringiensis* and Evidence of Its Presence on a Large Plasmid." *FEMS Microbiol Lett* 244, no. 2 (2005): 353-8.
- Milner, Richard J. "History Of *Bacillus Thuringiensis*". *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49, no. 1 (1994): 9-13.
- Miranda, R., F. Z. Zamudio and A. Bravo. "Processing of Cry1ab Delta-Endotoxin from *Bacillus Thuringiensis* by *Manduca Sexta* and *Spodoptera Frugiperda* Midgut Proteases: Role in

- Protoxin Activation and Toxin Inactivation." *Insect Biochem Mol Biol* 31, no. 12 (2001): 1155-63.
- Moharil Mangesh. "Distribution of vip Genes, Protein Profiling and Determination of Entomopathogenic Potential of Local Isolates of *Bacillus Thuringiensis*." *Bt Research Bt*, 2013. doi:10.5376/bt.2013.04.0003.
- Morris-Coole, C. "Bacillus Thuringiensis: Ecology, the Significance of Natural Genetic Modification, and Regulation." *World J Microbiol Biotechnol* 11, no. 5 (1995): 471-7.
- Naimov, S., M. Weemen-Hendriks, S. Dukiandjiev and R. A. de Maagd. "Bacillus Thuringiensis Delta-Endotoxin Cry1 Hybrid Proteins with Increased Activity against the Colorado Potato Beetle." *Appl Environ Microbiol* 67, no. 11 (2001): 5328-30.
- Noguera, P. A. and J. E. Ibarra. "Detection of New Cry Genes of *Bacillus Thuringiensis* by Use of a Novel Pcr Primer System." *Appl Environ Microbiol* 76, no. 18 (2010): 6150-5.
- Osman, G. H., S. K. Assem, R. M. Alreedy, D. K. El-Ghareeb, M. A. Basry, A. Rastogi and H. M. Kalaji. "Development of Insect Resistant Maize Plants Expressing a Chitinase Gene from the Cotton Leaf Worm, *Spodoptera Littoralis*." *Sci Rep* 5, (2015): 18067.
- Palma, Leopoldo, Iñigo Ruiz De Escudero, Mireya Maeztu, Primitivo Caballero, and Delia Muñoz. "Screening of Vip Genes from a Spanish *Bacillus Thuringiensis* Collection and Characterization of Two Vip3 Proteins Highly Toxic to Five Lepidopteran Crop Pests." *Biological Control* 66, no. 3 (2013): 141-49.
- Park, S. J., S. Y. Park, C. M. Ryu, S. H. Park and J. K. Lee. "The Role of Aiaa, a Quorum-Quenching Enzyme from *Bacillus Thuringiensis*, on the Rhizosphere Competence." *J Microbiol Biotechnol* 18, no. 9 (2008): 1518-21.
- Perani, M., A. H. Bishop and A. Vaid. "Prevalence of Beta-Exotoxin, Diarrhoeal Toxin and Specific Delta-Endotoxin in Natural Isolates of *Bacillus Thuringiensis*." *FEMS Microbiol Lett* 160, no. 1 (1998): 55-60.
- Perchat, S., C. Buisson, J. Chaufaux, V. Sanchis, D. Lereclus and M. Gohar. "Bacillus Cereus Produces Several Nonproteinaceous Insecticidal Exotoxins." *J Invertebr Pathol* 90, no. 2 (2005): 131-3.
- Perez, C., L. E. Fernandez, J. Sun, J. L. Folch, S. S. Gill, M. Soberon and A. Bravo. "Bacillus Thuringiensis Subsp. *Israelensis* Cyt1aa Synergizes Cry11aa Toxin by Functioning as a Membrane-Bound Receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, no. 51 (2005): 18303-8.
- Pingali, P. L. "Green Revolution: Impacts, Limits, and the Path Ahead." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, no. 31 (2012): 12302-8.
- Portugal, L., J. L. Gringorten, G. F. Caputo, M. Soberon, C. Munoz-Garay and A. Bravo. "Toxicity and Mode of Action of Insecticidal Cry1a Proteins from *Bacillus Thuringiensis* in an Insect Cell Line, Cf-1." *Peptides* 53, (2014): 292-9.

- Promdonkoy, B. and D. J. Ellar. "Investigation of the Pore-Forming Mechanism of a Cytolytic Delta-Endotoxin from *Bacillus Thuringiensis*." *Biochem J* 374, no. Pt 1 (2003): 255-9.
- Rajagopal, R., N. Arora, S. Sivakumar, N. G. Rao, S. A. Nimbalkar and R. K. Bhatnagar. "Resistance of *Helicoverpa Armigera* to Cry1ac Toxin from *Bacillus Thuringiensis* Is Due to Improper Processing of the Protoxin." *Biochem J* 419, no. 2 (2009): 309-16.
- Rang, C., P. Gil, N. Neisner, J. Van Rie and R. Frutos. "Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus Thuringiensis*." *Appl Environ Microbiol* 71, no. 10 (2005): 6276-81.
- Raymond, B., P. R. Johnston, C. Nielsen-LeRoux, D. Lereclus and N. Crickmore. "Bacillus Thuringiensis: An Impotent Pathogen?" *Trends Microbiol* 18, no. 5 (2010): 189-94.
- Reyes-Ramirez, A. and J. E. Ibarra. "Plasmid Patterns of *Bacillus Thuringiensis* Type Strains." *Appl Environ Microbiol* 74, no. 1 (2008): 125-9.
- Roh, J. Y., Q. Liu, D. W. Lee, X. Tao, Y. Wang, H. J. Shim, J. Y. Choi, J. B. Seo, M. Ohba, E. Mizuki and Y. H. Je. "Bacillus Thuringiensis Serovar Mogi (Flagellar Serotype 3a3b3d), a Novel Serogroup with a Mosquitocidal Activity." *J Invertebr Pathol* 102, no. 3 (2009): 266-8.
- Romeis, J., M. Meissle and F. Bigler. "Transgenic Crops Expressing *Bacillus Thuringiensis* Toxins and Biological Control." *Nat Biotechnol* 24, no. 1 (2006): 63-71.
- Rosas-García, Ninfa María. "Avances En El Desarrollo De Formulaciones Insecticidas A Base De *Bacillus Thuringiensis*". *Revista Colombiana de Biotecnología*, no. 1 (2016): 49-63.
- Rose Gomes, Monnerat. "Endophytic Colonization By Brazilian Strains Of *Bacillus Thuringiensis* On Cabbage Seedlings Grown In Vitro". *Bt Research* (2012).
- Ruiu, L. "Brevibacillus Laterosporus, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species." *Insects* 4, no. 3 (2013): 476-92.
- Ruiu, L. "Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management." *Insects* 6, no. 2 (2015): 352-67.
- Salazar-Marroquin, E. L., L. J. Galan-Wong, V. R. Moreno-Medina, M. A. Reyes-Lopez and B. Pereyra-Alferez. "Bacteriocins Synthesized by *Bacillus Thuringiensis*: Generalities and Potential Applications." *Rev Med Microbiol* 27, no. 3 (2016): 95-101.
- Sambrook, Joseph and David W Russell. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sansinenea, Estibaliz. *Bacillus Thuringiensis Biotechnology*. Chapter 1: Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*. Dordrecht: Springer, 2012.
- Sauka, D. H. and G. B. Benintende. "[*Bacillus Thuringiensis*: General Aspects. An Approach to Its Use in the Biological Control of Lepidopteran Insects Behaving as Agricultural Pests]." *Rev Argent Microbiol* 40, no. 2 (2008): 124-40.

- Sauka, D. H., R. E. Basurto-Rios, J. E. Ibarra and G. B. Benintende. "Characterization of an Argentine Isolate of *Bacillus Thuringiensis* Similar to the Hd-1 Strain." *Neotrop Entomol* 39, no. 5 (2010): 767-73.
- Sebesta, K. and K. Horska. "Mechanism of Inhibition of DNA-Dependent Rna Polymerase by Exotoxin of *Bacillus Thuringiensis*." *Biochim Biophys Acta* 209, no. 2 (1970): 357-76.
- Seifinejad, A., G.R. Salehi Jouzani, A. Hosseinzadeh, and C. Abdmishani. "Characterization Of Lepidoptera-Active Cry And Vip Genes In Iranian *Bacillus Thuringiensis* Strain Collection". *Biological Control* 44, no. 2 (2008): 216-226.
- Selinger, L. B., G. G. Khachatourians, J. R. Byers and M. F. Hynes. "Expression of a *Bacillus Thuringiensis* Delta-Endotoxin Gene by *Bacillus Pumilus*." *Can J Microbiol* 44, no. 3 (1998): 259-69.
- Sivakumar, S., R. Rajagopal, G. R. Venkatesh, A. Srivastava and R. K. Bhatnagar. "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, no. 10 (2007): 7312-9.
- Soberon, M., J. A. Lopez-Diaz and A. Bravo. "Cyt Toxins Produced by *Bacillus Thuringiensis*: A Protein Fold Conserved in Several Pathogenic Microorganisms." *Peptides* 41, (2013): 87-93.
- Soberon, M., L. E. Fernandez, C. Perez, S. S. Gill and A. Bravo. "Mode of Action of Mosquitocidal *Bacillus Thuringiensis* Toxins." *Toxicon* 49, no. 5 (2007): 597-600.
- Soberon, M., L. Pardo-Lopez, I. Lopez, I. Gomez, B. E. Tabashnik and A. Bravo. "Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance." *Science* 318, no. 5856 (2007): 1640-2.
- Soufiane, B. and J. C. Cote. "Discrimination among *Bacillus Thuringiensis* H Serotypes, Serovars and Strains Based on 16s Rrna, Gyrb and Aroe Gene Sequence Analyses." *Antonie Van Leeuwenhoek* 95, no. 1 (2009): 33-45.
- Soufiane, B., M. Baizet and J. C. Cote. "Multilocus Sequence Analysis of *Bacillus Thuringiensis* Serovars Navarrensensis, Bolivia and Vazensis and *Bacillus Weihenstephanensis* Reveals a Common Phylogeny." *Antonie Van Leeuwenhoek* 103, no. 1 (2013): 195-205.
- Steinhaus, Edward A. "Possible Use Of *Bacillus Thuringiensis* Berliner As An Aid In The Biological Control Of The Alfalfa Caterpillar". *Hilg* 20, no. 18 (1951): 359-381.
- Steinhaus, Edward A. and Elizabeth A. Jerrel. "Further Observations On *Bacillus Thuringiensis* Berliner And Other Sporeforming Bacteria". *Hilg* 23, no. 1 (1954): 1-23.
- Subashini, M., A. Moushumi Priya, B. Sundarakrishnan and S. Jayachandran. "Recombinant *Gluconacetobacter Diazotrophicus* Containing Cry1ac Gene Codes for 130-Kda Toxin Protein." *J Mol Microbiol Biotechnol* 20, no. 4 (2011): 236-42.

- Tabashnik, B. E., & Carrière, Y. (2015). Successes and failures of transgenic bt crops: Global patterns of field-evolved resistance. *Bt Resistance*, n.d.
- Teixeira Correa, R. F., D. M. Ardisson-Araujo, R. G. Monnerat and B. M. Ribeiro. "Cytotoxicity Analysis of Three *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Israelensis* Delta-Endotoxins Towards Insect and Mammalian Cells." *PLoS One* 7, no. 9 (2012): e46121.
- Thomas, W. E. and D. J. Ellar. "Bacillus Thuringiensis Var *Israelensis* Crystal Delta-Endotoxin: Effects on Insect and Mammalian Cells in Vitro and in Vivo." *J Cell Sci* 60, (1983): 181-97.
- Vachon, V., R. Laprade and J. L. Schwartz. "Current Models of the Mode of Action of *Bacillus Thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins: A Critical Review." *J Invertebr Pathol* 111, no. 1 (2012): 1-12.
- Versalovic, James, Frans J. de Bruijn and James R. Lupski. "Repetitive Sequence-Based Pcr (Rep-Pcr) DNA Fingerprinting of Bacterial Genomes." In *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*, edited by Frans J. de Bruijn, James R. Lupski and George M. Weinstock, 437-454. Boston, MA: Springer US, 1998.
- Vetrovsky, T. and P. Baldrian. "The Variability of the 16s Rrna Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses." *PLoS One* 8, no. 2 (2013): e57923.
- Vilas-Boas, G. T., A. P. Peruca and O. M. Arantes. "Biology and Taxonomy of *Bacillus Cereus*, *Bacillus Anthracis*, and *Bacillus Thuringiensis*." *Can J Microbiol* 53, no. 6 (2007): 673-87.
- Walters, F. S., C. M. Stacy, M. K. Lee, N. Palekar and J. S. Chen. "An Engineered Chymotrypsin/Cathepsin G Site in Domain I Renders *Bacillus Thuringiensis* Cry3a Active against Western Corn Rootworm Larvae." *Appl Environ Microbiol* 74, no. 2 (2008): 367-74.
- Wiwat, C., S. Thaithanun, S. Pantuwatana and A. Bhumiratana. "Toxicity of Chitinase-Producing *Bacillus Thuringiensis* Ssp. *Kurstaki* Hd-1 (G) toward *Plutella Xylostella*." *J Invertebr Pathol* 76, no. 4 (2000): 270-7.
- Wu, J., F. Zhao, J. Bai, G. Deng, S. Qin and Q. Bao. "Evidence for Positive Darwinian Selection of Vip Gene in *Bacillus Thuringiensis*." *J Genet Genomics* 34, no. 7 (2007): 649-60.
- Xiang, W. F., X. L. Qiu, D. X. Zhi, Z. X. Min, L. Yuan and Y. Z. Quan. "N546 in Beta18-Beta19 Loop Is Important for Binding and Toxicity of the *Bacillus Thuringiensis* CryIac Toxin." *J Invertebr Pathol* 101, no. 2 (2009): 119-23.
- Xu, D. and J. C. Cote. "Sequence Diversity of *Bacillus Thuringiensis* Flagellin (H Antigen) Protein at the Intra-H Serotype Level." *Appl Environ Microbiol* 74, no. 17 (2008): 5524-32.
- Xuanjun, Fang. "Characterization Of A New Highly Toxic Isolate Of *Bacillus Thuringiensis* From The Diapausing Larvae Of Silkworm And Identification Of CryIa 22 Gene". *Bt Research* (2010).

- Yu, X., T. Liu, X. Liang, C. Tang, J. Zhu, S. Wang, S. Li, Q. Deng, L. Wang, A. Zheng and P. Li. "Rapid Detection of Vip1-Type Genes from *Bacillus Cereus* and Characterization of a Novel Vip Binary Toxin Gene." *FEMS Microbiol Lett* 325, no. 1 (2011): 30-6.
- Yu, X., T. Liu, Z. Sun, P. Guan, J. Zhu, S. Wang, S. Li, Q. Deng, L. Wang, A. Zheng and P. Li. "Co-Expression and Synergism Analysis of Vip3aa29 and Cyt2aa3 Insecticidal Proteins from *Bacillus Thuringiensis*." *Curr Microbiol* 64, no. 4 (2012): 326-31.
- Yu, Zonglan, Liye He, Li Gong, Ganghui Huang, Yao Liu, Ping Li, and Aiping Zheng. "Cloning And Characterisation Of A Novel Cry1h Gene Effective Against Lepidopterous Larvae From A *Bacillus Thuringiensis* Strain". *Biocontrol Science and Technology* 25, no. 12 (2015): 1483-1492.
- Zhang, B., M. Liu, Y. Yang and Z. Yuan. "Cytolytic Toxin Cyt1aa of *Bacillus Thuringiensis* Synergizes the Mosquitocidal Toxin Mtx1 of *Bacillus Sphaericus*." *Biosci Biotechnol Biochem* 70, no. 9 (2006): 2199-204.
- Zuniga-Navarrete, F., I. Gomez, G. Pena, I. Amaro, E. Ortiz, B. Becerril, J. E. Ibarra, A. Bravo and M. Soberon. "Identification of *Bacillus Thuringiensis* Cry3aa Toxin Domain Ii Loop 1 as the Binding Site of *Tenebrio Molitor* Cadherin Repeat Cr12." *Insect Biochem Mol Biol* 59, (2015): 50-7.

XI. Anexos

Anexo 1

Secuencia parcial del gen de la cepa LBIT-1200 que codifica para la proteína flagelina

```
GAATTCGCCCTTAGTACATGCGCCAAAACCAAGACAAAATGAACACTTCTATGAACCG  
TTTATCTAGCGGTAAATCAATTAACAGTGCAGCTGACGATGCGGCTGGCTTAGCTATTG  
CTACTCGTATGCGTGCGAAAGAAGGCGGATTAACGTTGGAGCACGTAACACACAAGA  
CGCTATGTCTGCTTTACGTAAGTGGTACGCTGCATTAGGTTCTGTTTCAAACATCTTACT  
TCGTATGCGTGATCTTGCAACACAAGCATCAAGCGGTAACAACGATAAAGATATC  
GCATCTATGGACAAAGAGTATCAAGCATTAGCACAAAGAAATTGATCATATTGCTGACA  
AAACAAATTTCAACGGTAACGCATCTTTAAGTGGTGGTGGGAAAGATATCACAATTCA  
GCTTTCTGACGCTTCAAATGATACAATGAAAATCACAGCTATCGATACAAAAGCTATA  
ACAACGCAACTTTAGCTACACCTACAGCTACAGGCGCAGATAAGGCTTTAAATGCAG  
CTTCTGCACCAGCTCAAATCACAGCTCTTGACACTGCTATTCAAGAAATTGCTGACGCT  
AGAGCAACTTTTCGGTTCTCAATTAACCGTTTAGACCATAACTTAAACAACGTAACGA  
GCCAAGCTACTAATATGGCAGCTTCTGCTTCTCAAATTGAAGATGCTGATATGGCAAAA  
GAAATGTCTAACATGACAAAGTTCAAATTTTAAACGAAGCAGGCATCAGCATGCTTT  
CTCAAGCAAACAAGGGCGAATTC
```

Anexo 2

Secuencia parcial de los genes de la cepa LBIT-1200 empleados en MSLT

glpF

CTGGTTGGATTGTAATTACAATGGGCTGGGGCTTAGCGGTAGCGGTTGCAGCATATGC
GGTTGGATCAATTAGTGGGGCACATTTGAATCCAGCTTTAACAATAGGATTAGCATTTA
AGGGAGCGTTCCCATGGAGTGACGTACCTGGTTATATCGCAGCACAAATGATTGGGGC
AATTATCGGGGCAGTTATCGTATATTTACATTACTTACCACACTGGAAAGAAACAGAA
GATCCAGGAACAAAGTTAGGTGTATTTGCAACAGGTCCAGCAATTCCGAACACATTTG
CAAACCTTTTAAGTGAAATGATTGGAACATTCGTTTTAGTATTTGGTATATTAGCAATT
GGTGCAAATAAATTTGCAGATGGATTAATCCATTTATCGTAGGTTTCTTAATTGTAAG
TATTGGTTTATCATTAGGCGGGACAACAGGATACGCAATTAACCCAGCGCGTGATTTG
GGTCCGCGTATCGCACACTTCTTCCT

tpi

TACTTGGCCACTCTGAGCGTTCGTGAAATGTTTGTGAAACAGATGAGTCAGTAAACAA
AAAGACTATCGCAGCATTGAACATGGTTAACAACCAATCGTATGTTGTGGTGAGACTT
TAGAAGAGCGCGAAAGCGGAAAAACATTTGATCTAGTAGCAGGTCAAGTGACAAAAG
CACTTGCAGGTTTAAACAGAAGAGCAAGTTAAAGCAACTGTTATCGCTTATGAGCCAAT
CTGGGCTATCGGTACAGGTAATCTTCTTCTTCTGCAGATGCAAACGAAGTATGTGCGC
ACATCCGTAAAGTTGTTGCAGAAGCTGTTTCTCCAGAAGCTGCAGAAGCTGTTCTGATC
CAATACGGCGGTAGCGTAAAACCAGAAAACATTAAGAGTATATGGCACAATCTGACA
TCGACGGCGCTTTAGTTGGCGGTGCTAGCTTAGAGCCTGCTTCGTTCTTAGGTCTTCTG
GGGGCGGTAAAATGAGAAAGCCAACAGCTTTAATCATTCTT

pycA

ATTCTTTAGAAAACTATCTCACTATTGGGAAGATGTACGCAAATACTATGCACCGTTT
GAAAGTGGTATGAATGCGCCTCATAACAGAGGTATATATGCATGAAATGCCGGGTGGGC
AGTATAGTAATCTTCAGCAACAAGCGAAGGCGGTTGGTTTAGGAGATCGCTTCGATGA
AGTGAAAGTAATGTACCGCCGTGTGAATGACATGTTTGGAGATATTGTAAGTAACA
CCATCATCAAAAGTTGTTGGTGATATGGCATTATTTATGGTTCAAAACCATCTAACAGA
ACAAGATGTTTTAGAGCGTGGACATGCGATGGACTTCCCAGGGTCTGTTGTTGAAATGT
TCTCTGGTGATTTAGGTCAACCGTACGGTGGTTTCCCGAAAGAATTACAAAAGATTATT
TTAAAAGGGAAAGAGCCATTAACAGTAAGACCAGGTGAATTACTAGAGCCAGTAGATT
TCGAAGCGTTAAAAGAAGAATTATTCCAT

ilvD

AAGGAAGTTATTCACTCTCTTGAAAACCCTCATAGTGAGGAAGGAGGATTGCGTATAT
TAAAAGGCAACCTTGCGAAAGATGGAGCGGTTATTAAGCGGTGCAACAGAGGTAA
AGCGTTTTGAAGGACCTTGCGTATTTTTTAATTCACAAGATGAGGCACTTGCTGGCATT
ATGCTTGGGAAAGTGAAAAAAGGAGATGTAGTTGTCATTTCGTTACGAAGGACCAAGAG
GTGGCCCTGGTATGCCAGAAATGTTAGCACCAACATCAGCAATTGCTGGAATGGGATT
AGGTGCTGAGGTTGCATTATTAACGGATGGACGTTTCTCTGGAGCTTCACGTGGAATTT
CAGTAGGACATATTTACCAGAAGCAGCAGCTGGTGGAAACAATCGCACTTCTTGAACA
AGGGGATATTGTATGTATTGATGTTGAAGAACGCTTGCTAGAAGTAAGAGTGAGTAAT
GAAGAATTAGATAAGCGTAAAAAAGAATGGAA

gmk

CGTTTTCTACTACATAGTCGTAAGCGTCCATCATCTCGATTTCTTCTTTTCGCTACAGTTA
AACGATTTTCAATAACATCTTCAGTCTCTGTACCACGTCCGACAATACGGCTCTTTAGT
TCAGATAAACTTGGAGGTGCTAAGAAAATAAATACACCTTCTGGGAAAGCTTTCTTAA
CTTGAATTGCTCCTTGCACCTCAATTTCTAAGAATACATCTTTTCCTTCTTGTAATGTTTT
TTCAACATAGTCAATCGGTGTTCCGTAATAATTACCTACGAACTCAGCCCACTCAAGTA
ATTTTTATTACGAATCATTTCCTCGAATTTCTTCTTTCTTTAAAGAAAATAATCCACAC
CATCTACTTCACCTTCACGCGGCTTACGTGTCGTTACTGAAATAGAGTACTGAAAACGT
GTATCCTCATGGCTAAACAGCTCTTTACGAACCGTCCCTTTTCCAACCCAGAAAGGCC
TGAAAGAACGATGAGCAATCCT

pur

ACCTTTTGTAGAGAAGCTTAAACATAGCAACGCGTGGATCAATGCCGAATAACTCAGCA
GTTTTCGCACTTTCGATACCGATTTTACGCTAAATCTTGGCTGTTTGGTGCAATGTTAATT
GCGCAATCAGCGAATACATATTTCTTCTTTCACGTACCATGATGAATACGCCAGAAGT
TTTTGTAACACCTGGTTTTGTTTTAATAATTTGAAGTGTGCTGGACGAACTGTATCAGCTGT
AGAGTGAGCTGCACCACTTACTAGACCGTGTGCTTTGCCATGTATACAAGCATTGTAC
CGAAGTAGTTTTCGTCTTTAAGGATTTTTCGAGCGTCTTCTTCAGTTGCTTTACCTTTAC
GGCGTTCAACGAAAGATGCTACCATCGCATCCATTTCTTCGTATGTAGCTGGGTGCTAA
ATATCAACGCCTGCTAATGTTAAATTCATGCTAGCAGCTTTTTCGCTAATTTCTTCTCTA
TTACCAACTAAGATTGGTTTTACTAACTCTTCTTTT

pta

AAAAGAAGAGTTAGTAAAACCAATCTTAGTTGGTAATAGAGAAGAAATTAGCGCAA
AGCTGCTAGCATGAATTTAACATTAGCAGGCGTTGATATTTACGACCCAGCTACATACG
AAGAAATGGATGCGATGGTAGCATCTTTCGTTGAACGCCGTAAAGGTAAAGCAACTGA
AGAAGACGCTCGAAAATCCTTAAAGACGAAAACCTTTCGGTACAATGCTTGTATAC
ATGGGCAAAGCACACGGTCTAGTAAGTGGTGCAGCTCACTCTACAGCTGATACAGTTC
GTCCAGCACTTCAAATTTAAAACAAAACCAGGTGTTACAAAACTTCTGGCGTATTC
ATCATGGTACGTGAAGAAGAGAAATATGTATTCGCTGATTGCGCAATTAACATTGCAC
CAAACAGCCAAGATTTAGCTGAAATCGGTATCGAAAGTGCGAAAACCTGCTGAGTTATT
CGGCATTGATCCACGCGTTGCTATGTTAAGCTTCTCTACAAAAGGTTCTGCGAAATCTC
CAGAAACAGAAAAAGTTGTAGAAG

gmk

CCACAATTGCTTTAATTCTATCACAAGCTAATTCAACTTGATCGTTTTCTACTACATAGT
CGTAAGCGTCCATCATCTCGATTTCTTCTTTTCGCTACAGTTAAACGATTTTCAATAACAT
CTTCAGTCTCTGTACCACGTCCGACAATACGGCTCTTTAGTTCAGATAAACTTGGAGGT
GCTAAGAAAATAAATACACCTTCTGGGAAAGCTTTCTTAACTTGAATTGCTCCTTGCAC
TTCAATTTCTAAGAATACATCTTTTCCTTCTTGTAATGTTTTTTCAACATAGTCAATCGG
TGTTCCGTAATAATTACCTACGAACTCAGCCCACTCAAGTAATTTTTTATTACGAATCA
TTTCCTCGAATTTCTTCTTTCTTTAAAGAAAATAATCCACACCATCTACTTCACCTTCAC
GCGGCTTACGTGTCGTTACTGAAATAGAGTACTGAAAACGTGTATCCTCATGGCTAAAC
AGCTCTTTACGAACCGTCCCTTTTCCaACCCAGAAAGGCCCTGAAAGAACGATGAGCAA
TCCT

Anexo 3

Secuencia de nucleótidos del gen 16s rDNA de la cepa LBIT-1200

ATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGT
CACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGG
CAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAG
AACAAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAAC
CGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
CTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTT TAGT
GCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT
TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGA
CCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC
GCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG
GTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAG

Anexo 4

Secuencia de nucleótidos del gen *gyrB* (topoisomerasa) de la cepa LBIT-1200

ATTACGCCAAGCTCAGAATTAACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACG
AATTCGCCCTTTTAAATATCAAGGTTTTTCACGTATTTTGCATTCTCTTGGATAAAGTTA
CGACGTGGCTCTACTTTATCTCCCATTAATAATTTCAAATGTTTCGTCTGCTTCAATTGCA
TCTTGAAGGGAACTTGAAGTAATGAACGTACTTCTGGATCCATTGTCGTCTCCCATAG
CTGAGTTGGATTCAATTTCCCCTAGACCTTTATAACGCTGAATCCCTGGCTTAGGTTTGGC
CGGTAATTCTGCTAAGATTTTTTCAAGTTCCTTATCGTTGTAAGCATATTGAATTTTTTT
ACCTTGTTGTATTTTAAACAACGGCGGCTGTGCAATATAGATATAACCACACTCAATTA
TTTGACGCATATAACGATAGAAGAACGTTAATAATAGGGTACGAATATGTGCACCATC
AACATCGGCATCGGTCATAATAAACCTTATGATAGCGTGCTTTTTCAATATCGAAGT
CTCCACCAATATTTGTACCAATCGCCGTAATAATTGTACGAACTTCATCATTTGATAAA
ATCTTATCTAAGCGTGCCTTTTCCACATTAATAATTTTACCCTTCAGCGGTAAAATTGCT
TGGAATGACGATCGCGTCCTTGTTTTGCAGATCCACCCGCAGAGTCACCCTCTACGAT
GTAAATTTACTAATTGCTGGATCTTTCGAAGAGCAATCAGCTAATTTACCAGGTAAAC
TTGAACTTCTAACGCACTCTTTCGACGTGTCAATTCACGCGCTTTTTTCGCAGCTACAC
GTGCACGTGCAGCCATCGTACCTTTTTCTACAATTTTTCGCGCTACATTAGGATTTTCTA
GTAAGAACTTTTCAAACGCCTCTGAAAATACAGACTCTGTAATTGTTCTCGCTTCACTA
TTCCCAAGTTTTGTCTTCCGTTGGCCTTCAAATTGTGGATTTGGATGCTTGATTGATACA
ATTGCTGTAAACCTTCACGAACATCCTCACC

Anexo 5

Secuencia parcial del gen cry1Ac de la cepa LBIT-1200 correspondiente al segmento comprendido entre los bloques 1 y 5

TATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGTGTTTGGACA
AAGGTGGGGATTTGATGCCCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTA
TTGGCAACTATACAGATTATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAACGTGTATG
GGGACCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAATTAACACTA
ACTGTATTAGATATCGTTGCTCTGTTCCCGAATTATGATAGTAGAAGATATCCAATTCG
AACAGTTTCCCAATTAACAAGAGAAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGAT
GGTAGTTTTTCGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAAGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGA
TGGATATACTTAACAGTATAACCATCTATACGGATGCTCATAGGGGTTATTATTATTGG
TCAGGGCATCAAATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTTCGGGGCCAGAATTCACTTTTTCC
GCTATATGGA ACTATGGGAAATGCAGCTCCACAACAACGTATTGTTGCTCAACTAGGT
CAGGGCGTGTATAGAACATTATCGTCCACTTTATATAGAAGACCTTTTAATATAGGGAT
AAATAATCAACA ACTATCTGTTCTTGACGGGACAGAATTTGCTTATGGAACCTCCTCAA
ATTTGCCATCCGCTGTATACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTCGCTGGATGAAATACC
GCCACAGAATAACAACGTGCCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAGCCATGTT
TCAATGTTTCGTT CAGGCTTTAGTAATAGTAGTGTAAGTATAATAAGAGCTCCTATGTT
CTCTTGGATACATCGTAGTGCTGAATTTAATAATATAATTGCATCGGATAGTATTACTC
AAATCCCTGCAGTGAAGGGAACTTTCTTTTTAATGGTTCTGTAATTT CAGGACCAGGA
TTTACTGGTGGGGACTTAGTTAGATTAAATAGTAGTGGAATAACATTCAGAATAGAG
GGTATATTGAAGTTCCAATTCACTTCCCATCGACATCTACCAGATATCGAGTTCGTGTA
CGGTATGCTTCTGTAACCCCGATTCACCTCAACGTTAATTGGGGGTATTCATCCATTTTT
TCCAATACAGTACCAGCTACAGCTACGTCATTAGATAATCTACAATCAAGTGATTTTGG
TTATTTTTGAAAGTGCCAATGCTTTTACATCTTCATTAGGTAATATAGTAGGTGTTAGAA
ATTTTAGTGGGACTGCAGGAGTGATAATAGACGGATTTGAATTTATTCC

Anexo 6

Secuencia completa del gen *cryIAc* de la cepa LBIT-1200. Las sustituciones de nucleótidos con respecto al gen *cryIAc1* se representan en color azul oscuro

ITGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGA
AGTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCC
TTGTGCTAACGCAATTTCTTTTGGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGA
CTAGTTGATATAATATGGGGAATTTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACA
AATTGAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCT
AGATTAGAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGG
AAGCAGATCCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTCATGACAT
GAACAGTGCCCTTACAACCGCTATTCCTCTTTTTGCAGTTCAAATTTATCAAGTTCCTCT
TTTATCAGTATATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGT
GTTTGGACAAAGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAA
CTAGGCTTATTGGCAACTATACAGATTATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAA
CGTGTATGGGGACCGGATTCTAGAGATTGGGTAAGGTATAATCAATTTAGAAGAGAAT
TAACACTAACTGTATTAGATATCGTTGCTCTGTTCCCGAATTATGATAGTAGAAGATAT
CCAATTCGAACAGTTTCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAA
ATTTTGATGGTAGTTTTCGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAAGAAGTATTAGGAGTCC
ACATTTGATGGATATACTTAACAGTATAACCATCTATACGGATGCTCATAGGGGTTATT
ATTATTGGTCAGGGCATCAAATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTTCGGGGCCAGAATTC
ACTTTTCCGCTATATGGAACATGGAATGCAGCTCCACAACAACGTATTGTTGCTCA
ACTAGGTCAGGGCGTGTATAGAACATTATCGTCCACTTTATATAGAAGACCTTTTAATA
TAGGGATAAATAATCAACAACATCTGTTCTTGACGGGACAGAATTTGCTTATGGAACC
TCCTCAAATTTGCCATCCGCTGTATACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTCGCTGGATG
AAATACCGCCACAGAATAACAACGTGCCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAG
CCATGTTTCAATGTTTCGTTCAAGGCTTTAGTAATAGTAGTGTAAGTATAATAAGAGCTC
CTATGTTCTCTTGATACATCGTAGTGCTGAATTTAATAATATAATTGCATCGGATAGT
ATTACTCAAATCCCTGCAGTGAAGGGAACTTTCTTTTTAATGGTTCTGTAATTTTCAGG
ACCAGGATTTACTGGTGGGGACTTAGTTAGATTAATAGTAGTGGAATAACATTCAG
AATAGAGGGTATATTGAAGTCCAATTCATTCCTCCATCGACATCTACCAGATATCGAGT
TCGTGTACGGTATGCTTCTGTAACCCCGATTCACCTCAACGTTAATTGGGG**GT**ATTCAT
CCATTTTTTCCAATACAGTACCAGCTACAGCTACGTCATTAGATAATCTACAATCAAGT
GATTTTGGTTATTTTGAAGTGCCAATGCTTTTACATCTTCATTAGGTAATATAGTAGGT
GTTAGAAATTTTAGTGGGACTGCAGGAGTGATAATAGAC**G**GATTTGAATTTATTCCAGT
TACTGCAACACTCGAGGCTGAATATAATCTGGAAAGAGCGCAGAAGGCGGTGAATGCG
ITGTTTACGTCTACAAACCAACTAGGGCTAAAAACAAATGTAACGGATTATCATATTG
ATCAAGTGTCCAATTTAGTTACGTATTTATCGGATGAATTTTGTCTGGATGAAAAGCGA
GAATTGTCCGAGAAAGTCAAACATGCGAAGCGACTCAGTGATGAACGCAATTTACTCC
AAGATTCAAATTTCAAAGACATTAATAGGCAACCAGAACGTGGGTGGGGCGGAAGTAC
AGGGATTACCATCCAAGGAGGGGATGACGATTTAAAGAAAATTACGTCACTATCA
GGTACCTTTGATGAGTGCTATCCAACATATTTGTATCAAAAAATCGATGAATCAAAT
AAAAGCCTTTACCGTTATCAATTAAGAGGGTATATCGAAGATAGTCAAGACTTAGAA
ATCTATTTAATTCGCTACAATGCAAACATGAAACAGTAAATGTGCCAGGTACGGGTT
CCTTATGGCCGTTTCAGCCAAAGTCCAATCGGAAAGTGTGGAGAGCCGAATCGATG
CGCGCCACACCTTGAATGGAATCCTGACTTAGATTGTTTCGTGTAGGGATGGAGAAAAG
TGTGCCCATCATTGTCATCATTTCTCCTTAGACATTGATGTAGGATGTACAGACTTAAA
TGAGGACCTAGGTGTATGGGTGATCTTTAAGATTAAGACGCAAGATGGGCACGCAAGA
CTAGGGAATCTAGAGTT**I**TCGAAGAGAAACCATTAGTAGGAGAAGCGCTAGCTCGTG
TGAAAAGAGCGGAGAAAAAATGGAGAGACAAACGTGAAAAATTGGAATGGGAAACA

AATATCGTTTATAAAGAGGGCAAAGAATCTGTAGATGCTTTATTTGTAAACTCTCAATA
TGATCAATTACAAGCGGATACGAATATTGCCATGATTCATGCGGCAGATAAACGTGTT
CATAGCATTGAGAAGCTTATCTGCCTGAGCTGTCTGTGATTCCGGGTGTCAATGCGGC
TATTTTTGAAGAATTAGAAGGGCGTATTTTCACTGCATTCTCCCTATATGATGCGAGAA
ATGTCATTAATAAATGGTGATTTTAATAATGGCTTATCCTGCTGGAACGTGAAAGGGCAT
GTAGATGTAGAAGAACAAAACAACCAACGTTCGGTCCTTGTTGTTCCGGAATGGGAAG
CAGAAGTGTCACAAGAAGTTCGTGTCTGTCCGGGTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACA
GCATACAAGGAGGGATATGGAGAAGGTTGCGTAACCATTCATGAGATCGAGAACAAT
ACAGACGAACTGAAGTTTAGCAACTGCGTAGAAGAGGAAATCTATCAAATAACACGG
TAACGTGTAATGATTATACTGTAAATCAAGAAGAATACGGAGGTGCGTACACTTCTCG
TAATCGAGGATATAACGAAGCTCCTTCCGTACCAGCTGATTATGCGTCAGTCTATGAAG
AAAAATCGTATACAGATGGACGAAGAGAGAATCCTTGTGAATTTAACAGAGGGTATAG
GGATTACACGCCACTACCAGTTGGTTATGTGACAAAAGAATTAGAATACTTCCAGAA
ACCGATAAGGTATGGATTGAGATTGGAGAAACGGAAGGAACATTTATCGTGGACAGCG
TGGAATTACTCCTTATGGAGGAATAG

Anexo 7

Secuencia completa de la proteína Cry1Ac de la cepa LBIT-1200. Las sustituciones de aminoácidos se representan en color verde

LDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLSEFVPGAGFVLGLVDII
WGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALR
EEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDA
TINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIVALF
PNYDSRRYPPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGSAQGIERSIRSPHLMILNSITIYTDADR
GYYYWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGVYRTLSTLYRRPF
NIGINNQQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAVYRKSGTVDSLDEIPPQNNNVPPRQGFHRLSHV
SMFRSGFSNSSVSIIRAPMFSWIHRSAEFNNIIASDSITQIPAVKGNFLNFGSVISGPGFTGGDL
VRLNSSGNNIQNRGYIEVPIHFPSTSTRYRVRVRYASVTPIHLNVNWG**Y**SSIFSNTVPATATS
LDNLQSSDFGYFESANAFTSSLGNIVGVRNFSGTAGVIID**G**FEFIPVTATLEAEYNLERAQKA
VNALFTSTNQLGLKTNVTDYHIDQVSNLVTYLSDEFCLDEKRELSEKVKHAKRLSDERNLL
QDSNFKDINRQPERGWGGSTGITIQGGDDVFKENYVTLSGTFDECYPTYLYQKIDESKLKA
FTRYQLRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGTGSWPLSAQSPIGKCGEPNRCAPHLEW
NPDLDSCRDGEKCAHSHHFSLDIDVGCTDLNEDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEF**H**EE
KPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETNIVYKEAKESVDALFVNSQYDQLQADTNIA
MIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAFEELEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNGLSC
WNVKGHVDVEEQNNQRSVLVPEWEAEVSVQEVRCVCPGRGYILRVTAKEYGEGCVTIH
EIENNTDELKFSNCVEEEIYPNNTVTCNDYTVNQEEYGGAYTSRNRGYNEAPSVPADYASV
YEEKSYTDGRRENPCFNRYRDTPLPVGYVTKELEYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVE
LLLMEE