

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EFEECTO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Plodia interpunctella*
(HÜBNER) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) A *Bacillus thuringiensis*,
SU RELACIÓN CON LA FLORA MICROBIANA Y LA EXPRESIÓN
DE LA PROTEÍNA DE INMUNIDAD HEMOLINA

Tesis que presenta la

Q.B. Edith Refugio Rubio Cota

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Agosto del 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Plodia interpunctella*
(HÜBNER) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) A *Bacillus thuringiensis*,
SU RELACIÓN CON LA FLORA MICROBIANA Y LA EXPRESIÓN
DE LA PROTEÍNA DE INMUNIDAD HEMOLINA**

COMITÉ DE TESIS

Dra. Patricia Tamez Guerra
Presidente

Dra. Magdalena Iracheta
Secretario

Dr. Ricardo Gómez Flores
Vocal

Dr. José Alberto Valadéz Lira
Asesor Externo

San Nicolás de los Garza, N.L.

Agosto del 2012

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Formulación de Biológicos, mientras que la parte molecular se realizó en la Unidad de Inmunología Molecular del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

CRÉDITOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada de Maestría (219752).

Al Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA-ARS, Research and Scientific Exchange Division, 301-504-4545), por su colaboración y recursos otorgados para este trabajo. A la Dra. Brenda Oppert (Center for Grain and Animal Health Research, Manhattan, KS. USA) por la asesoría externa de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

	Página
PORTADA í .	I
COMITÉ DE TESIS í .	II
ÁREA DE TRABAJO í ..	III
CRÉDITOS í ..	III
AGRADECIMIENTOS í	IV
ÍNDICE GENERAL í .	V
LISTA DE FIGURAS í ...	VIII
LISTA DE TABLAS í	X
LISTA DE ABREVIATURAS í .	XI
RESUMEN í .	1
ABSTRACT í ..	2
1. INTRODUCCIÓN í	3
2. HIPÓTESIS í ...	5
3. OBJETIVO GENERAL í ...	6
3.1. Objetivos Específicos í ..í .	6
4. ANTECEDENTES í	7
4.1 Control Biológico í .	7
4.2 <i>Plodia interpunctella</i> í .	8
4.3 Inmunidad en Insectos í ..	9
4.3.1 Inmunidad innata en insectos í í í í í í í í í í í í í í í í	9
4.3.2 Reacciones humorales de insectos í í í í í í í í í í í í í í	10
4.3.3 Reacciones celulares de insectos í í í í í í í í í í í í í í	11
4.4 Péptidos Antimicrobianos í	12
4.5 Hemolina í ..	14
4.6 <i>Bacillus thuringiensis</i> í ..	15
4.7 Flora Microbiana í ..	17
4.8 Proteasas í	17

5. METODOLOGÍA	19
5.1 Material Biológico	19
5.1.1 Origen y cría masiva <i>P. interpunctella</i>	19
5.1.2 Cepas bacterianas	19
5.2 Bioensayos	20
5.3 Susceptibilidad a toxinas o productos de Bt	20
5.4 Bioensayo con Antibiótico	21
5.5 Obtención de intestino medio	22
5.6 Actividad antibacteriana del contenido intestinal	22
5.7 Identificación de genes por RT-PCR	23
5.7.1 Extracción de ARN de intestino medio de <i>P. interpunctella</i>	23
5.7.2 Cuantificación de ARN Total	24
5.7.3 Tratamiento del ARN total con ADNsa	25
5.7.4 Síntesis de ADNc a partir de ARN Bacteriano	25
5.7.5 Estandarización de RT-PCR	25
5.7.6 Análisis de la expresión de transcritos por RT-PCR	26
5.7.7 RT-PCR del ARN de intestino de larvas de <i>P. interpunctella</i>	26
5.8 Actividad Enzimática	27
5.8.1 Análisis de la actividad enzimática mediante transferencia (Activity blots)	28
5.8.2 Zimogramas	29
5.9 Aislamiento y cultivo de bacterias	29
A) Anaerobias	30
B) Aerobias	30
5.9.1 Prueba de Oxidasa	31
5.9.2 Identificación de Bacterias anaerobias y aerobias con Microplacas BIOLOG	31
5.9.2.1 Aislamiento en un medio de cultivo apropiado	31
5.9.2.2 Preparación y caracterización de cada colonia aislada	31
5.9.2.3 Preparación del inóculo	32

5.9.2.4 Inoculación de la Microplaca.....	34
5.9.3 Incubación.....	34
6. RESULTADOS.....	36
6.1 Actividad insecticida.....	36
6.2 Actividad antibacteriana del contenido intestinal de <i>P. interpunctella</i> ..	38
6.3 Expresión de Transcritos por RT-PCR.....	38
6.3.1 Expresión de S7 y Hemolina.....	38
6.4 Actividad Enzimática.....	40
6.5 Aislamiento e Identificación de Bacterias por RT-PCR.....	44
6.6 Porcentaje de mortalidad de <i>P. interpunctella</i> al exponerse a antibióticos y Biobit®.....	46
6.7 Aislamiento e Identificación de Bacterias por Biolog GN2.....	47
6.7.1 Bacterias aerobias.....	47
6.7.2 Bacterias anaerobias.....	48
7. DISCUSIÓN.....	53
8. CONCLUSIONES.....	63
9. BIBLIOGRAFÍA.....	64
10. ANEXO.....	72

LISTA DE FIGURAS

NOMBRE Y NÚMERO DE FIGURA	Página
Figura 1. Mecanismos de defensa en insectos.	10
Figura.2 Actividad insecticida del Biobit® contra larvas del segundo estadio de dos colonias de <i>Plodia interpunctella</i> de la generación F8 expuestas a 100 UI/g, usando un bioensayo de incorporación a dieta. Los resultados son el promedio de tres repeticiones	37
Figura. 3. Actividad inhibitoria del contenido intestinal de larvas del 4to estadio de cuatro colonias de <i>Plodia interpunctella</i>	39
Figura. 4. Gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de amplificación correspondientes al gen constitutivo S7 (de aproximadamente 880pb) del ARN ribosomal de <i>Plodia interpunctella</i> . Las larvas de ambas colonias permanecieron sin exponer a excepción del caso de bioensayos. Resultados realizados con la F14.	39
Figura. 5. Gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de amplificación correspondientes al gen transcrito del péptido antimicrobiano hemolina (de aproximadamente 810pb) del ARN ribosomal de <i>Plodia interpunctella</i> . Las larvas de ambas colonias permanecieron sin exponer a excepción del caso de bioensayos. Resultados realizados con la F18.	40
Figura. 6. Resultados del análisis enzimático mostrando actividad hidrolítica de dos colonias de <i>Plodia interpunctella</i> en base a su susceptibilidad a Bt	41
Figura. 7. Activity blots de dos colonias de <i>Plodia interpunctella</i> en base a su susceptibilidad a Bt:	44
Figura. 8. Zimograma para detectar la capacidad de hidrólisis a caseína de dos colonias de <i>Plodia interpunctella</i> en base a su susceptibilidad a Bt.	45
Figura. 9. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio mostrando las bandas de la amplificación de productos del análisis RT-PCR de ARN ribosomal extraído de larvas completas de <i>P. interpunctella</i>	45
Figura. 10. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> expuestas a Biobit® y antibióticos.	47
Figura. 11. Identificación bioquímica de los aislamientos obtenidos del intestino de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> empleando el método de corrimiento de 95 pruebas simultáneas el sistema Biolog GN2	49
Figura. 12. Resultados de las pruebas bioquímica del aislamiento correspondiente a colonias beige de 7 mm, bacilos Gram (-) obtenidos del intestino de larvas PIS de <i>Plodia interpunctella</i> empleando el método de corrimiento de 95 pruebas simultáneas el sistema Biolog GN2	50

<p>Figura. 13. Resultados de las pruebas bioquímica del aislamiento correspondiente a colonias de 3mm color blanco, mostrando ser bacilos cortos Gram (-), obtenido del intestino de larvas PIS y PIR de <i>Plodia interpunctella</i> empleando el método de corrimiento de 95 pruebas simultáneas el sistema Biolog GN2 Microplate</p>	<p>51</p>
<p>Figura. 14. Resultados de las pruebas bioquímica del aislamiento correspondiente a colonias beige de borde puntiformes, bacilos cortos Gram (-) obtenidos del intestino de larvas PIS de <i>Plodia interpunctella</i> empleando el método de corrimiento de 95 pruebas simultáneas el sistema Biolog GN2 Microplate,</p>	<p>52</p>

LISTA DE TABLAS

NOMBRE Y NÚMERO DE TABLA	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de flora intestinal de lepidópteros y hemolina en <i>P. interpunctella</i>	24
Tabla 2. Tratamientos y análisis realizados con las colonias de <i>P. interpunctella</i> susceptible (PIS) y resistente (PIR) de <i>P. interpunctella</i> a <i>Bacillus thuringiensis</i> , así como la generación en la que se realizaron.	35
Tabla 3. Actividad insecticida medida como concentración letal media (CL ₅₀) de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac o Cry1F, o del formulado comercial DiPel® (µg/g) de <i>Bacillus thuringiensis</i> , contra larvas del segundo estadio de dos colonias de <i>Plodia interpunctella</i> .	36
Tabla 4. Actividad insecticida medida como concentración letal media (CL ₅₀) del formulado comercial Biobit® (UI/g) de <i>Bacillus thuringiensis</i> , contra larvas del primer y tercer estadio de dos colonias de <i>Plodia interpunctella</i> .	38
Tabla 5. Actividad enzimática observada por análisis <i>activity blot</i> y zimogramas del jugo gástrico de dos colonias de <i>Plodia interpunctella</i> , una susceptible (PIS) y otra resistente (PIR) a <i>Bacillus thuringiensis</i> y observadas contra BApNA (tipo tripsina), SAAPFpNA (tipo quimiotripsina) o caseína	42
Tabla 6. Expresión de genes relacionados a la familia enterobacteriaceae entre las colonias PIS Y PIR de <i>P. Interpunctella</i> y la exposición al Biobit®	46
Tabla 7. Crecimiento colonial bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis del contenido intestinal de dos colonias de <i>Plodia interpunctella</i> , una susceptible (PIS) y otra resistente (PIR) a toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	48

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>P. interpunctella</i>	<i>Plodia Interpunctella</i>
<i>T. ni</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
<i>B. mori</i>	<i>Bombix mori</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. marscensens</i>	<i>Serratia marscensens</i>
<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
PAM	Péptidos Antimicrobianos
LPS	Lipopolisacáridos
SI	Sistema Inmune
RII	Respuesta Inmune Innata
G (+)	Gram Positivos
G (-)	Gram Negativos
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
K+	Iones Potasio
pH	Potencial de Hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcriptasa inversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
PIS	<i>Plodia interpunctella</i> susceptible
PIR	<i>Plodia interpunctella</i> resistente
USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos
DEPC	Dietilpirocarbonato
ADNc	Ácido Desoxiribonucleico complementario

OLIGO	Oligonucleótido
dNTP'S	Desoxirribonucleótido trifosfato
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TAE	Solución amortiguadora que contiene una mezcla de Tris base, ácido acético y EDTA
SDS	Sodio dodecil sulfato
SDS- PAGE	Sodio dodecil sulfato-poliacrilamida electroforesis en gel
APS	Persulfato de amonio
TEMED	Tetrametiletildiamina
SAAPFpNA	N-succinil-Ala-Ala-Pro-fenilalanina -nitroanilida
BapNA	N- α -Benzoil-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
NaNO ₃	Nitrato de sodio
NH ₄ SO ₃ NH ₂)	Sulfamato de amonio
HCl	Ácido clorhídrico
N	Normal
M	Molar
KDa	Kilodaltons
pb	Pares de bases
CO ₂	Dióxido de carbono
GN-NENT	Gram Negativos no entéricos
GN-ENT	Gram Negativos Entéricos
GN-FAS	Gram Negativos Fastidiosos
CL ₅₀	Concentración Letal Media
Mf	Factor de migración
g	Gramos
UI	Unidades Internacionales
UI/mg	Unidades Internacionales por miligramo
mL	Mililitro

mg/mL	Miligramos por mililitro
L	Microlitros
IU/g	Unidades Internacionales por gramo
mm	Milímetros
μg	Microgramo
μg/ L	Microgramos por microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
n	Número
°C	Grados Celsius
h	hora
1er	Primer
2do	Segundo
3er	Tercero
4to	Cuarto
5to	Quinto
	Alfa
	Beta
δ	Delta
	Para
	Gama

RESUMEN

Se considera que el lepidóptero *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) causa al menos un 10% en pérdidas de producción de granos y semillas, valor que representa cientos de millones de dólares. Para su control, se ha usado el bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* (Bt) por su seguridad y eficacia, pero se ha observado desarrollo de resistencia. Dicha resistencia se ha relacionado a cambios en su actividad enzimática y la unión de las toxinas al intestino de las larvas, pero poco se sabe del papel entre la flora microbiana y/o la producción de péptidos antimicrobianos. Nuestro objetivo fue determinar diferencias en la flora bacteriana y la expresión de hemolina entre dos colonias de *P. interpunctella*, una susceptible y otra resistente. Para detectar diferencias por la presencia de esporas de Bt, ambas colonias se expusieron a productos y toxinas de Bt, además de antibióticos y en el 4to estadio larvario se obtuvieron intestinos para evaluar las diferencias en la actividad enzimática, flora microbiana y el péptido antimicrobiano hemolina. De los intestinos se midió la actividad antibacteriana contra Gram (-) y se aislaron e identificaron las bacterias por pruebas bioquímicas. En general los resultados mostraron menor actividad de tipo quimiotripsina en la colonia resistente y nula actividad de tipo tripsina y quimiotripsina en larvas expuestas a antibióticos, pero mayor actividad de caseinasa en ambas colonias, de las que se amplificó el gen correspondiente a Enterobacterias, al igual que de hemolina. Únicamente en el intestino de la colonia resistente se detectó hemolina y se observó actividad antibacteriana contra *E. coli*; mientras que en la colonia susceptible se observó una mayor cantidad y diversidad bacteriana. Las diferencias encontradas podrían sugerir una posible relación entre susceptibilidad a Bt de *P. interpunctella* con la actividad enzimática tipo quimiotripsina y el control de la flora bacteriana mediada por la hemolina.

ABSTRACT

It is considered that the lepidopteran *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) causes at least 10% in lost production of grains and seeds, which represents hundreds of millions of dollars. For its control, it has been used the biopesticide *Bacillus thuringiensis* (Bt) for its safety and efficacy, but there has been observed resistance development. This resistance has been linked to changes in its enzymatic activity and binding of toxins to the intestine of the larvae, but little is known about the role of microbial flora and/or antimicrobial peptides production. Our objective was to determine differences in bacterial flora and the expression of hemolin between two colonies of *P. interpunctella*, one susceptible and one resistant. To determine any difference by the spore presence, both colonies were exposed to Bt products or toxins plus antibiotics. The 4th instar guts were obtained to assess differences in enzyme activity, microbial flora the antimicrobial peptide hemolina. Using intestine material, the antibacterial activity against Gram (-) was measured, and it was cultured for bacterial growth. Bacteria were isolated and identified by biochemical tests. Results showed lower chymotrypsin-like activity in the resistant colony and no activity of trypsin and chymotrypsin in larvae exposed to antibiotics, but more caseinase activity in both colonies. In addition, Enterobacteria genes were amplified, as well as the hemolin. Hemolin was only detected in the gut of the resistant colony, which developed antibacterial activity against *E. coli*, whereas the susceptible colony had higher bacterial diversity. The differences found may suggest a possible link between susceptibility to Bt in *P. interpunctella* with quimitripsin-like activity and bacterial flora control mediated by hemolin.

1. INTRODUCCIÓN

Los daños provocados por insectos en granos almacenados pueden ser similares a los causados a los cultivos. Se estima que del 5 al 10% de la producción mundial se pierde a causa de los insectos plaga, lo que equivale a la cantidad de granos necesaria para alimentar a 130 millones de personas anualmente (Arias, 1993).

Plodia interpunctella (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), conocida como la polilla de la fruta seca, es un insecto plaga que ataca a diversos tipos de granos y semillas, además de cereales. Es originaria de Europa y en la actualidad se disemina por todo el mundo. Las larvas blancas o rosadas de *P. interpunctella* se alimentan de granos y sus productos derivados, por ejemplo, harinas, galletas, una variedad de frutos secos, nueces, leche en polvo, chocolate, caramelos y arreglos de flores secas. Otros productos susceptibles de ser consumidos por esta plaga son especies secas, semillas para aves y alimento deshidratado para perros que contengan carne y cereal. La polilla se reproduce a lo largo de todo el año en situaciones domiciliarias, donde la temperatura ambiente estable favorece su desarrollo (Garrison, 2006).

En los productos almacenados se tiende cada vez más a utilizar métodos de control de insectos con tratamientos localizados de insecticidas. Para realizar estos tratamientos con éxito, es preciso detectar la invasión a tiempo, conocer las áreas donde se inicia y determinar la eficacia de las medidas tomadas para el control de la plaga (ECONEX, 1998). En la época actual, es de suma importancia el desarrollo de nuevas alternativas biológicas para el manejo y control de los insectos plaga, y así poder reemplazar aquellos compuestos sintéticos, a los cuales muchos de estos organismos, con el paso del tiempo, han desarrollado resistencia (Galán-Wong *et al.*, 1996). La aplicación de productos a base de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bt) es de los métodos de control biológico más utilizados hoy en día. Dentro de esta especie, existen numerosas subespecies que producen diferentes proteínas con actividad insecticida a una variedad de insectos de diferentes órdenes. Durante la esporulación, esta bacteria produce proteínas llamadas Cry. En el medio alcalino del aparato digestivo de la larva, la proteína (pro-toxina) es activada por las enzimas allí presentes, que la cortan, liberando su parte tóxica (endotoxina). La proteína adherida a las membranas celulares del intestino, altera el equilibrio osmótico celular, causando la lisis de las células de la pared interior del tracto digestivo, provocando que la larva deje de alimentarse debido al vómito,

diarrea y parálisis del tracto digestivo en pocos minutos, y muere a escasos días (Casini y Santa, 2005). A este respecto, se ha evaluado el control de *P. interpunctella* a semillas transgénicas que expresan toxinas Cry de Bt (Giles *et al.*, 2000; Sedlacek *et al.*, 2001).

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son importantes componentes de la inmunidad innata y es un sistema de defensa para varias especies. Estos PAM pueden ser encontrados en mamíferos, anfibios, insectos y plantas (Brahmachary, 2004) y generalmente contienen de 15 a 45 residuos de aminoácidos y en su gran mayoría poseen carga positiva, además de que tienen la propiedad de ser anfipáticos. Estos péptidos son secretados por células epiteliales y leucocitos, como es el caso de los macrófagos y neutrófilos. En la actualidad, con base en la traducción de secuencias en programas computacionales, se han descrito más de 800 tipos de PAM distribuidos en los reinos animal y vegetal (Rivas *et al.*, 2006).

Un estudio que se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, muestra que hay relación en la susceptibilidad del insecto *Trichoplusia ni* (Hübner) a Bt, con los cambios de proteasas en el intestino del mismo. Después de esto se inicia la evaluación de la actividad de proteasa en el intestino medio y de que manera afecta en la susceptibilidad de Cry toxinas o protoxinas de Bt en el laboratorio, con larvas de *T. ni* (Iracheta, datos sin publicar). Otro estudio realizado ahí mismo, indica que la expresión de PAM en diferentes estadios de larvas de colonias seleccionadas de campo y laboratorio de *T. ni*, estaba relacionada con exposición a Bt y otras bacterias. Algunos de los datos sugieren que la expresión de PAM, se puede relacionar con la exposición anterior a Bt en el laboratorio o en campo, y los patrones de expresión pueden de una manera relacionarse a la susceptibilidad de las toxinas de Bt (Tamez-Guerra *et al.*, 2008).

En el 2006, se reportó que *Enterobacter* sp. es de las bacterias predominantes en el intestino de la palomilla gitana, donde los resultados del estudio demostraron que la mortalidad inducida por Bt dependía de las bacterias presentes (Broderick *et al.*, 2006).

Por esto, el principal objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la susceptibilidad de colonias de *P. interpunctella* a *B. thuringiensis* y estudiar su relación con la actividad enzimática, la flora microbiana y la expresión de la proteína de inmunidad hemolina a nivel de intestino medio.

2. HIPÓTESIS

La susceptibilidad de *Plodia interpunctella* a *Bacillus thuringiensis* se reduce por cambios en la actividad enzimática y su flora microbiana a nivel intestinal y mayor expresión de la proteína de inmunidad hemolina

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las diferencias de la susceptibilidad de dos colonias de *Plodia interpunctella* una susceptible y otra resistente a *Bacillus thuringiensis*, en la actividad enzimática, la expresión de la proteína de inmunidad hemolina y la flora microbiana a nivel intestinal del insecto.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1.1 Evaluar la actividad insecticida de Biobit® sobre larvas de las dos colonias de *Plodia interpunctella*: una resistente y otra susceptible a Bt.
- 3.1.2 Analizar la actividad enzimática del intestino en ambas colonias, sin exponer o expuestas a un producto a base de Bt, y con y sin antibióticos.
- 3.1.3 Detectar la producción de Hemolina y la presencia de bacterias de la familia Enterobacteriaceae en las dos colonias de *P. interpunctella*, sin exponer o expuestas a un producto a base de Bt
- 3.1.4. Aislar e identificar bacterias aerobias y anaerobias presentes en el intestino medio de ambas colonias

4. ANTECEDENTES

La protección de semillas constituye uno de los permanentes desafíos para los profesionales e investigadores que trabajan en la protección vegetal y aún más si no se cuenta con la herramienta más recurrida, que son los insecticidas de origen sintético. Sin embargo, existen una serie de métodos naturales de control que permiten obtener niveles satisfactorios de protección a los cuales se puede recurrir cuando, por ejemplo, se trata de un sistema orgánico de producción (Silva, 2002).

Los granos almacenados constituyen un agroecosistema complejo, esto se debe a que se producen una serie de interacciones entre luz, temperatura, humedad y agentes bióticos (insectos y hongos). Después de la cosecha los cereales pueden ser atacados por numerosos insectos y los daños que estos causan pueden ser directos e indirectos (Larrain, 1994). Los directos consisten en alimentarse propiamente de la semilla, contaminarlas con sus desechos o disminuir el porcentaje de germinación y los indirectos son elevar la temperatura, diseminar las esporas de los hongos e incluso atacar y dañar el material de empaque y estructuras de las bodegas (Serna, 1996). La infestación puede producirse ya sea en el campo, durante el transporte o en el almacén (Ramayo, 1983). En base a todas estas consideraciones es que se deben tomar las medidas de control necesarias (Silva, 2002).

4.1 Control Biológico

Hoy en día uno de los métodos más utilizados es el control biológico el cual ha sido una herramienta en el manejo de plagas en la agricultura, cuyos inicios se remontan a China 200 años A.C. En esos tiempos los agricultores utilizaban cañas de bambú para comunicar los árboles y permitir que las hormigas circularan de un árbol a otro comiendo insectos plagas. En épocas más modernas, a fines del siglo XIX, en Norteamérica, se introdujo accidentalmente una plaga de los cítricos (*Icerya purchasi* Maskell), la cual fue controlada con la introducción desde Australia de la catarinita *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Gerdin, 2005). En 1988 Nigam y Mukerji indicaban que el control biológico es la manipulación directa o indirecta por parte del hombre de los agentes vivos que, de forma natural tienen capacidad de control, esta manipulación provoca un incremento de su capacidad de inhibición de las enfermedades.

Apuntaban también a que la relación biológica entre los agentes de control y los patógenos es bastante específica, de tal forma que se debe buscar un método de control para cada enfermedad (Viñas *et al.*, 2003). El control biológico por definición, consiste en la aplicación de técnicas compatibles con la conservación del medio ambiente mediante el uso de los enemigos naturales de las plagas que actuando de un modo natural, controlan el nivel poblacional de las especies plaga sin ocasionar problemas de contaminación ni de residuos (Guardián y Sibaja, 2003).

4.2 *Plodia interpunctella*

Plodia interpunctella (Hüber) pertenece a la orden: Lepidóptera, familia: Pyralidae. También llamada palomilla india de la harina o polilla de la fruta seca, se distingue fácilmente de otras polillas porque el primer tercio de las alas anteriores es de un color canela claro o ligeramente amarillento y los dos tercios restantes son de color café rojizo. Se considera una plaga secundaria en los granos secos y sanos; y plaga primaria en harinas, frutas secas y otros productos. A nivel nacional tiene gran importancia económica pues destruye el embrión de los granos destinados a semilla. En otros productos, además del daño causado por su alimentación, contamina con telas y deyecciones. Tiene una gran capacidad de vuelo, porque las reinfestaciones son constantes. Las hembras depositan de 100 a 500 huevos aislados o en grupos en los productos almacenados. La larva, cuando está completamente desarrollada mide aproximadamente 13 mm de longitud. Es de color blanquecino, pudiendo ser ligeramente verdosa o con tintes rosados. Tiene tres pares de patas verdaderas y 4 pares de falsas patas en el abdomen. La larva totalmente desarrollada hila una tela sedosa, dejando hilos de seda cuando se arrastra en donde se acumulan deyecciones de la larva y partículas de producto y llega a cubrir la superficie del producto infestado con esta tela. La transformación de huevecillo a adulto demora, aproximadamente 26 días. La larva antes de pupar, busca lugares protegidos lo que dificulta aún más su control. En primavera y verano, con el aumento de la temperatura, las poblaciones de *Plodia* incrementan notablemente. La larva se alimenta de una gran variedad de productos farináceos, fruta seca, leche en polvo, chocolates, nueces, almendras, maní, etc. Se distribuye en todo el mundo. Generalmente no completa su desarrollo bajo 10°C. Los adultos son de corta vida y no se alimentan de productos almacenados (Arias, 1993).

4.3 Inmunidad en insectos

4.3.1 Inmunidad innata en insectos

Se han analizado las diversas reacciones de defensa y efectos patogénicos de bacterias en insectos, como resultado a infecciones provocadas por hongos, virus, protozoarios, parásitos y nematodos. Los insectos muestran resistencia a ciertas infecciones. Ésta resistencia se basa en un sistema de inmunidad innata, que contiene órganos compuestos de diferentes tipos de células con variedad de moléculas y células circulando por la hemolinfa, además de distintos componentes del sistema inmune como glándula linfoide, cuerpo graso y los hemocitos particularmente del mesodermo. La glándula linfoide está conformada por lóbulos pericardiales y se encuentra en la parte final anterior de la vesícula dorsal y es la que forma los hemocitos, estos están involucrados en las defensas del insecto. El cuerpo graso esta hecho de tejido adiposo pegado a la superficie interna de la cutícula y está distribuido en todos los segmentos; este es un órgano funcional análogo al hígado en mamíferos y responsable de la síntesis de péptidos antimicrobianos (PAM) (Vilmos y Kurucz, 1998).

El complejo inmunitario lo forman diversos sistemas: celulares y humorales, los cuales están coordinados para protegerse de una invasión por microorganismos. Los mecanismos de defensa en insectos están mediados o estimulados por el reconocimiento de compuestos de superficie de microorganismos: en gram-positivas, los peptidoglucanos, en gram-negativas los lipopolisacáridos y en hongos el β -1-3 glucano. Así también, la defensa se evidencia por mecanismos de transducción de señales que desencadenan la expresión de PAM, factores de opsonización, cascadas de proteasas serinas, etc. (Fig.1). La manifestación de la respuesta inmune en insectos se presenta como inmunidad humoral procesada en tres diferentes reacciones: coagulación de la hemolinfa, melanización y síntesis de péptidos antimicrobianos. La inmunidad celular está dada o efectuada hacia microorganismos o hacia células apoptóticas que son fagocitadas o capturadas por formación de nódulos o encapsuladas por hemocitos (Vilmos y Kurucz, 1998).

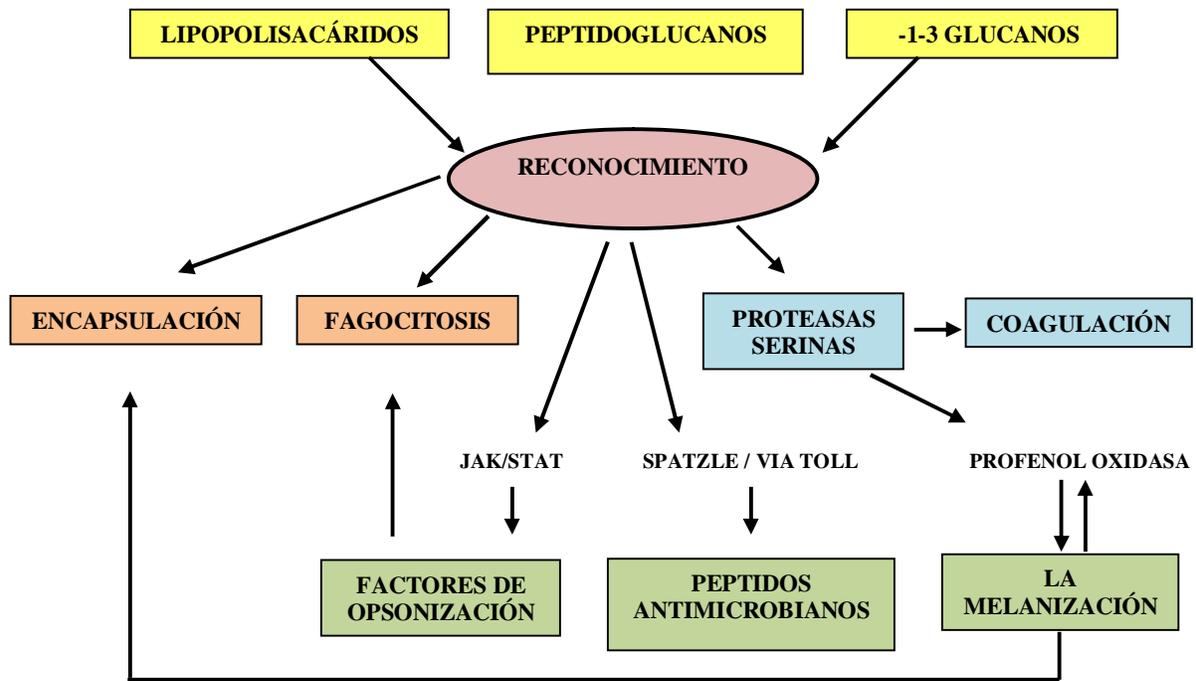


Figura 1. Mecanismos de defensa en insectos.

4.3.2 Reacciones humorales de insectos

Coagulación de la hemolinfa: existen dos mecanismos de coagulación en insectos, uno de ellos ha sido analizado en la cacerola de mar (*Limulus polyphemus*), aquí actúan los lipopolisacáridos (LPS) o peptidoglicanos (1-3)-D-glucano, mediando la activación de la coagulación activada por medio de la cascada de las serín-proteasas. El otro mecanismo se ha observado en la cucaracha *Leucophaea maderae*; en ésta, la polimerización de las proteínas del coágulo son catalizadas por transglutaminasa dependiente de calcio y liberada por los hemocitos. Las proteínas coagulantes son la lipoforina y la vitelogenina (Vilmos y Kurucz, 1998).

Melanización: es la producción del pigmento melanina que contiene quinonas y aniones de superóxido y son tóxicos a microorganismos. La melanina es sintetizada por la enzima fenol-oxidasa, por la que es transformada a una forma que activa la cascada de serín proteasas, donde la proenzima profenoloxidasa es formada en los hemocitos y después liberada

por ruptura celular y llevada a la cutícula o depositada alrededor de los parásitos encapsulados (Vilmos y Kurucz, 1998).

Proteínas de respuesta inmune: esta reacción humoral a la infección es mediante la formación de PAM y es rápida. La síntesis principal es en el cuerpo graso, aunque también se sintetizan en células epiteliales de la cutícula, glándulas salivales, hemocitos, tracto reproductor e intestino. Estos PAM son diferentes en estructura, los péptidos maduros son anfipáticos, actúan hacia membranas y eliminan a células extrañas por lisis. Como resultado a cada infección se forman PAM, los cuales actúan sobre diferentes componentes de la envoltura microbiana. Entre los péptidos que se activan para la respuesta inmune, se han encontrado lisozimas, gloverinas, leboquinas, defensinas, drosomicinas, dipterocinas, cecropinas y atacinas (Vilmos y Kurucz, 1998).

4.3.3 Reacciones celulares de insectos

Fagocitosis. Las células que fagocitan por lo general representan una subpoblación de hemocitos de insectos. Ambas células granulares y plasmocitos son los principales responsables de la fagocitosis. Las moléculas de superficie de las células fagocíticas muestran similitud a los receptores encontrados en las células fagocíticas de mamíferos (Vilmos y Kurucz, 1998).

Formación de nódulos. Mientras se da la formación del nódulo, los insectos agregan hemocitos para atrapar bacterias. Los nódulos pueden pegarse a los tejidos para ser encapsulados. La lectina de insectos, llamada escolexina, se le encontró y se ve involucrada en la formación de nódulos en *Manduca sexta*. Esta escolexina se produce en células de intestino medio y tejido epidermal (Vilmos y Kurucz, 1998).

Encapsulación. Este es un mecanismo de defensa multicelular donde la cápsula se forma por traslapes de capas de hemocitos y alrededor de protozoarios, nematodos y huevecillos de larvas parásitas. La encapsulación no induce expresión de PAM, pero si se le relaciona con la melanización en la cual contribuye a eliminar el patógeno (Vilmos y Kurucz, 1998).

4.4 Péptidos Antimicrobianos

En 1913 el fisiólogo químico Lawrence J. Henderson planteó que los seres vivos poseen una condición o capacidad de adaptación especial al medio ambiente a la que llamó *fitness* o ajuste fisiológico, que está íntimamente relacionado con la eficacia del sistema inmune (SI). Los organismos, especialmente los eucariotes superiores poseen al menos uno de los componentes del SI. El primero de ellos, la respuesta inmune innata (RII) coadyuva al acondicionamiento por medio de una primera línea de defensa a través de mecanismos celulares como la fagocitosis. Además la síntesis de receptores de reconocimiento de antígenos microbianos específicos tipo Toll, los mecanismos moleculares como la vía del complemento, la síntesis de moléculas parecidas a los anticuerpos y la síntesis de péptidos antimicrobianos (PAM) complementan la RII (Villarruel *et al.*, 2004).

De acuerdo con Boman *et al.* (1996), la historia de los PAM inicia con Pasteur, quien supuestamente descubrió la ciencia de la inmunología, al construir la teoría de la enfermedad causada por gérmenes. Su contemporáneo Mechnikoff descubrió la fagocitosis y se le consideró el padre de la inmunología celular. Los primeros indicios de que existían péptidos catiónicos con actividad microbicida se observaron en las plantas. Desde hace 50 años se sabe que las tioninas realizan una función antimicrobiana en las plantas e inhiben el crecimiento de bacterias y hongos *in vitro*. Además, en 1972 por primera vez se demostró que las tioninas inhiben el crecimiento de un número considerable de bacterias patógenas sugiriendo por tanto, que este péptido juega un papel protector muy importante. Los primeros trabajos que se realizaron en el campo de los PAM en animales fueron reportados a principios de los 80's en el laboratorio de Boman *et al.* (1996). Ellos inyectaron bacterias a pupas de un tipo de polilla del género cecropia, después de siete días detectaron en la hemolinfa de las pupas la presencia de un péptido catiónico de 37 aminoácidos con actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram (-). En 1987 Michael Zasslof descubrió que la piel de la rana *Xenopus laevis* Wagler contenía glándulas ricas en péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana, mismos que denominó magaininas. Estos péptidos alteran la permeabilidad de las células bacterianas causando un trastorno en el metabolismo y provocando lisis celular. Se conocen hasta ahora más de 800 PAM, con algunas redundancias. El producto primario es una pre-proteína de 62 a 170aa, posteriormente procesada para la formación del péptido maduro activo, que es de pH básico,

debido a que las membranas bacterianas generalmente tienen cargas negativas. La mayoría de las pre-proteínas tienen secuencia señal típica (Boman *et al.*, 1996). La evolución de los genes para estos péptidos, se ha transferido horizontalmente. Sin embargo, el número de exones e intrones se conserva entre las especies (Villarruel *et al.*, 2004).

Los insectos pueden deshacerse de infecciones microbianas rápidamente produciendo una variedad de moléculas inducidas por el sistema inmune, incluyendo péptidos y polipéptidos antibacterianos y anti-fúngicos. Se aislaron dos péptidos de la hemolinfa de la mosca *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, insectos experimentalmente infectados (con la siguiente secuencia de aminoácidos HGVSGHGQHGVHG (aloferon 1) y GVSFGHGQHGVHG (aloferon 2) (Chernysh *et al.*, 2002).

En otro trabajo realizado con el escarabajo *Zophobas atratus* Fabricius, se detectó en la hemolinfa actividad antibacteriana muy alta mediante un ensayo de inhibición de crecimiento en placa. De la hemolinfa se aislaron tres péptidos (A, B y C), lo que explicaba probablemente ésta actividad. Al evaluarlas por separado se comprobó que el péptido A tenía actividad bactericida contra bacterias Gram (-) y los péptidos B y C contra las Gram (+) (Bulet, 1991).

En un trabajo realizado en la Universidad Marie Curie-Skodowska en Lublin Polonia, realizaron la purificación y caracterización bioquímica de dos PAM obtenidos de la hemolinfa de *Galleria mellonella* L. Los PAM se aislaron de la hemolinfa de la larva inmunizada con bacteria viable, empleando una secuencia de cromatografía en fase reversa. El primer péptido era un miembro de la familia de la cecropina, mientras que el segundo era rico en residuos de prolina y tenía una secuencia única (Mak *et al.*, 2001).

También en Japón describieron un PAM nuevo el cual fue aislado de la hemolinfa del gusano *Bombyx mori* Lebanon, muestra actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. El nuevo péptido consistía de 42 aminoácidos y era altamente alcalino. Este péptido no indicó ninguna semejanza con otros PAM, y mostró una fuerte actividad bactericida contra algunas bacterias Gram (-) y principalmente contra Gram (+) (Hara y Yamakawa, 1995).

En el Instituto de Sericultura y Ciencia Entomológica, se aislaron tres PAM nuevos estructuralmente relacionados de la hemolinfa de *B. mori* inmunizado con *Escherichia coli*. Estos 3 PAM mostraron actividad antibacteriana contra bacterias Gram (-) como *Acinetobacter sp.* y *E. coli* (Hara y Yamakawa, 1995).

Finalmente, la acción protectora de los PAM se ha observado y usado en plantas y animales por millones de años, ya que llenan muchos de los requerimientos que demandan las industrias farmacéutica, agrícola, acuícola y alimentaria. Aunque forman parte de un mecanismo de defensa ancestral, los PAM representan un futuro prometedor en la lucha contra microorganismos patógenos (Montaño y Vargas, 2002). Ante esta perspectiva se abre un amplio campo de investigación, tanto en ciencia básica como en la biotecnología y bioingeniería, para la generación de nuevos agentes terapéuticos.

4.5 Hemolina

La hemolina es una proteína de inmunidad que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Faye y Kanost, 1998). Los genes de expresión y la síntesis de esta proteína son fuertemente estimuladas en el cuerpo graso de insectos lepidópteros cuando son tratados con bacterias o lipopolisacáridos (LPS), un componente de la superficie bacteriana (Lindstrom-Dinnetz *et al.*, 1995).

Moléculas de hemolina son sintetizadas y liberadas en la hemolinfa y se unen a la superficie bacteriana (Daffre y Faye, 1997). Sin embargo, la unión de hemolina a las células bacterianas no provoca la actividad bactericida, pero contribuye a la modulación de la fagocitosis (Andersson y Steiner, 1987). La hemolina también se une a hemocitos y previene su agregación (Bettencourt *et al.*, 1999). Se cree que la hemolina actúa como una molécula de reconocimiento celular en la respuesta inmune (Faye y Kanost, 1998).

Estructuralmente la molécula de hemolina consiste en 4 dominios que son altamente similares a las moléculas de las células de adhesión neurales, incluyendo amalgamas y neuroglianes de insectos y en humanos la proteína L1 (Su *et al.*, 1998; Lanz-Mendoza y Faye, 1999).

Por su parte, Aye *et al.* (2008) observaron que esta proteína (hemolina) se expresaba en el estadio de pupa en *P. interpunctella* y también cuando esta era inducida con inyección de bacterias en el 4to y 5to estadio larvario.

El cuerpo graso y los hemocitos son los principales tejidos que se encargan de la producción de hemolina y otras moléculas de respuesta inmune en insectos. Sin embargo, la expresión hemolina se detecta en varios tejidos de insectos, como el intestino medio, ocelos y

los tejidos neurales de desarrollo a pupa (Bettencourt *et al.*, 1997; Yu y Kanost, 1999). La expresión de hemolina también se produce en los folículos, la epidermis y tejido neuronal embrionario exterior e interior (Bettencourt *et al.*, 2000; Gorman *et al.*, 2004). Experimentos con el ARN de interferencia, indican que hemolina es esencial para la supervivencia de los embriones en la próxima generación (Bettencourt *et al.*, 2002), así como para la función del sistema inmune (Eleftherianos *et al.*, 2007; Terenius *et al.*, 2007). La hemolina aparentemente tiene diferentes funciones en diversos tejidos y es vital para el desarrollo. La expresión de ésta, es regulada ya sea por invasiones microbiológicas o diversos eventos en desarrollo, como proteínas del sistema inmune (Dunn *et al.*, 1994). Aquí es donde se encuentra con que la expresión de hemolina es específica a nivel tejido y desarrollo. Y según un estudio realizado en República de Corea, la epidermis de larvas del 5to instar de *P. interpunctella* es el principal tejido retro-regulado por cualquiera de las bacterias o tratamientos hormonales (Aye *et al.*, 2008).

4.6 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram-positiva usada como el ingrediente activo para la agricultura en los insecticidas biológicos y para el control de vectores de enfermedades. La bacteria forma endosporas y su actividad bioinsecticida radica en una proteína paraesporal o cuerpo de inclusión (cristal, toxinas Cry). La inclusión está compuesta de uno ó más tipos de pro -endotoxinas. Entre éstas se encuentran las proteínas Cry que están al frente de los pesticidas en la ingeniería genética de plantas.

Las proteínas Cry se liberan sólo bajo lisis celular y son selectivamente tóxicas a algunos invertebrados (lepidópteros, coleópteros y dípteros). Los cristales son protoxinas y deben de ser activadas antes de que tengan cualquier efecto. La proteína cristalina es altamente insoluble en condiciones neutras y se solubiliza en condiciones de pH alto (9.5). La activación ocurre por una discreta proteólisis causada por las enzimas estomacales del insecto. Una vez solubilizado en el tubo digestivo del insecto la protoxina se rompe por una proteasa para producir una toxina activa. Esta toxina se une a las células epiteliales del tubo digestivo creando poros en la membrana celular y propicia un desequilibrio de iones resultando en la

pérdida de iones K⁺, alterando la presión osmótica. El animal muere debido a una entrada masiva de agua, el sistema digestivo se paraliza, las células epiteliales se lisan y el pH estomacal se baja por descompensación con el pH sanguíneo. Esta baja de pH hace posible que las esporas bacterianas germinen y la bacteria pueda invadir el huésped causando una septicemia letal y daños en los tejidos. Generalmente, los insectos intoxicados mueren por ayuno y posterior detención del crecimiento que puede durar algunos días. Las larvas afectadas por las toxinas de Bt se vuelven inactivas, y podrían devolver la comida o tener diarrea. La cápsula de la cabeza podría aparecer más larga que el cuerpo (deformada). La larva se vuelve flácida y muere, generalmente en unos días o semanas. El contenido del cuerpo se vuelve marrón-negruzco según se va descomponiendo (Sansinenea, 2002).

En Manhattan se desarrolló un método para separar las proteinasas en una mezcla compleja en dos dimensiones, seguidas por la detección de la actividad a una clase específica de proteínas (Oppert, 1999). Usando este método, se evaluó la actividad de la serina proteasa con extractos de intestino de *P. interpunctella*. Con N-benzoyl-L-arginina-nitroanilida se identificaron tres grupos importantes de por lo menos seis de los asociados con actividad tipo tripsina, mientras que con N-succinil-alanil-L-pro-fenilalanina-nitroanilida se detectaron dos grupos de al menos cinco asociados con actividad tipo quimiotripsina. Este método permite la identificación de diversas poblaciones de insectos lepidópteros con actividad de proteinasas (Oppert, 2006).

En la Universidad de Georgia, los insectos con proteinasas alteradas pudieron evitar la intoxicación con toxinas de Bt. Por lo tanto, se compararon las actividades de las proteinasas de extractos de intestino de colonias de *Heliothis virescens* (F.) susceptible (YDK) y resistente (YHD2-B, CXC y KCBhyb) a Bt para concluir que los extractos de intestino examinados de la larva de las colonias susceptibles y resistentes mostraban diferencias en la actividad enzimática del intestino (Karumbaiah *et al.*, 2007).

Se ha reportado la presencia de la N-aminopeptidasa en varios insectos lepidópteros resistentes a las toxinas Cry1A de Bt. Por tanto, se hizo un PCR y secuenciación del ADN de aminopeptidasas de colonias de *P. interpunctella* susceptible (RC688) y resistente (HD198) a Bt. Los niveles de expresión del ARNm de la aminopeptidasa eran ligeramente más altos en las colonias de Bt resistentes, que en las colonias susceptibles (Cheng *et al.*, 2000).

4.7 Flora microbiana

La Universidad de Wisconsin publicó la asociación de bacterias en larvas de *Lymantria dispar* al amplificar por PCR el gen ribosomal 16S de α -Proteobacterias, *Actinobacterium* y *Cytophaga*, entre otros. Estos resultados proporcionaron la primera descripción comprensiva de la diversidad microbiana en el intestino medio del lepidóptero mencionado (Broderick *et al.*, 2004).

En Tokio, Japón, se realizó un estudio utilizando cebadores específicos para 16S y 23S de RNA ribosomal para las familias Enterobacteriaceae, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Clostridium perfringens* por RT-qPCR, en el cual se detectaron poblaciones de bacterias comensales (Matsuda *et al.*, 2007). A este respecto, en el departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Connecticut encontraron una diversidad de comunidad bacteriana en el intestino de sanguijuelas y se detectaron simbiontes adicionales, incluidos los miembros de la familia α , δ , γ - *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Worthen *et al.*, 2006). En otro estudio se aislaron un total de 102 cepas bacterianas de los intestinos de 65 moscas domésticas recogidas de varios lugares públicos, y por medio de análisis filogenéticos moleculares se colocan en 22 géneros diferentes, la mayoría identificadas como enteropatógenas para humanos. Con los aislamientos puros se logró construir una biblioteca de genes a partir del RNA ribosomal 16S, y los análisis de secuencias apoyaron los resultados del cultivo (Gupta *et al.*, 2012).

4.8 Proteasas

Las proteinasas luminarias están involucradas en la activación y/o solubilización de la protoxina de Bt, así como de la mediación de toxicidad. Se han descrito a la caseína, la tripsina y la quimiotripsina, como las principales enzimas que intervienen en la activación/degradación de protoxina de Bt para su activación a toxina (Milne y Kaplan *et al.*, 1993; Lecadet y Dedonder, 1967; Tojo y Aizawa, 1983). Como la quimiotripsina es una proteinasa del tracto digestivo del gusano de seda *B. mori*, tiene relación en la disolución de cristales de Bt subsp.

kurstaki HD-1 (Tojo *et al.*, 1986). En el mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, una proteínasa como la tripsina, es aparentemente necesaria para procesar la inclusión paraesporal, mientras que la quimiotripsina y termolisina están involucradas en el procesamiento de solubilización de la protoxina evaluada (Dai y Gill, 1993). En varios reportes se han descrito las propiedades de las proteinasas de extractos de intestino de *Plodia* (McGaughey y Johnson, 1992). En ellos se ha reportado que la máxima digestión de caseína se produce a un pH alcalino de 9.0 (Christeller *et al.*, 1992). La actividad proteolítica de gelatina es importante ya que se asocia con múltiples enzimas con masas moleculares de 20-50 kDa, según lo determinado por medio de zimogramas. Resultados de experimentos en donde usaron proteínas específicas e inhibidores de diagnóstico, se determinó que las enzimas principales de *Plodia* tienen actividad hidrolítica contra tripsina y quimiotripsina (Christeller *et al.*, 1992; McGaughey y Johnson, 1992).

Dentro del manejo integrado del control de *P. interpunctella* se contempla el empleo de productos a base de Bt (Mohandass *et al.*, 2007). De hecho, *P. interpunctella* fue el primer insecto en el que se reportó desarrollo de resistencia a Bt (McGaughey, 1985). Se sabe que la mayoría de los lepidópteros tienen intestino medio altamente alcalino, por lo cual predomina la actividad de las proteasas serinas. En un estudio realizado en India, se encontró que la actividad de la proteasa alcalina de intestino medio de *Spodoptera litura* Fabricius, va en aumento en el desarrollo de la larva y disminuye al iniciar la fase de pupa (Ahmad *et al.*, 1976).

La comprensión del mecanismo de resistencia proporciona estrategias para prevenir o retrasar la resistencia y por lo tanto prolongar la vida útil de las toxinas Cry de Bt como un bionsecticida seguro (Van-Rie *et al.*, 1990). Diferentes estudios han mostrado la relación entre la actividad enzimático del intestino con la diferencia en la susceptibilidad a diferentes proteínas tóxicas (Cry) de Bt.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material Biológico

5.1.1 Origen y cría masiva de *Plodia interpunctella*

Se evaluaron dos colonias del lepidóptero *P. interpunctella*, una susceptible (PIS) y otra resistente (PIR) a Bt, ambas obtenidas de la colección de insectos de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación de Granos Almacenados del USDA-ARS, Manhattan, KS. Estas colonias de lepidópteros mantenidas en dieta artificial siguiendo las condiciones reportadas por McGaughey y Beeman (1988). Ambas colonias se mantuvieron según las indicaciones dadas para este lepidóptero, con ciclos de luz: oscuridad de 14:10 h, temperatura en incubación, de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del $55\% \pm 10\%$. La metodología de la cría de *P. interpunctella*, se efectuó agregando aproximadamente 30 g de dieta artificial (a base de trigo molido, fibra de trigo, germen de trigo, levadura, miel, glicerina y agua) en frascos de vidrio previamente lavados. La dieta se inoculó con aproximadamente 0.050-0.070 g de los huevecillos, se taparon con una tela porosa de manera que permitiera la entrada de oxígeno, pero al mismo tiempo evitara que las larvas salieran del frasco. Dos semanas después y ya que las larvas habían alcanzado el 4to estadio larvario, se colocaron de 1 a 3 carretes de cartón para permitir que las larvas puparan dentro. Al pasar una semana, se removieron los carretes de cartón y se colocaron en un recipiente, el cual se tapó con tul, para contener los insectos adultos y permitir que pusieran sus huevos. La recolección de posturas de huevecillos se recogieron poniendo el recipiente boca abajo, y los huevecillos caían, y de aquí nuevamente se iniciaba otro ciclo. El ciclo de vida fue de aproximadamente 26 d.

5.1.2 Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas bacterianas seleccionadas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Serratia marscesens* del cepario del Laboratorio de Bacteriología de la FCB-UANL. Todos los medios de cultivo utilizados fueron de la marca BIOXON, México.

5.2 Bioensayos

Para probar la susceptibilidad a Bt de larvas de las colonias PIS y PIR de *P. interpunctella*, estas se expusieron al formulado comercial Biobit® DF que contiene las protoxinas Cry1Aa1, Cry1Ab1, Cry1Ac1, Cry2Aa1 y Cry2Ab1; mientras que para determinar la susceptibilidad entre colonias y en los ensayos de actividad enzimática se empleo el DiPel®, que contiene las mismas protoxinas, ambos elaborados a base de esporas y cristales de Bt var. *kurstaki* con una potencia de 32,000 UI/mg (Valent BioScience DE México, S.A de C. V., Zapopan, Jal., MX). La técnica que se utilizó para la realización de los bioensayos fue por aplicación directa de la suspensión del producto de Bt sobre la dieta artificial y homogeneizar por agitación (Johnson *et al.*, 1991). Para observar la susceptibilidad a Biobit®, los huevos de cada cepa de *P. interpunctella* se expusieron al formulado, usando dosis en base a unidades internacionales por miligramo (UI/mg). La actividad insecticida para determinar la concentración letal media (CL₅₀) se obtuvo de acuerdo a la supervivencia de larvas analizadas a los 10 días después de la exposición.

5.3 Susceptibilidad a toxinas o productos de Bt

La actividad insecticida de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F y del producto comercial DiPel® fue evaluada en ambas colonias (PIS y PIR), a partir de una dosis (20 mg/mL) en 100 L por gramo de dieta y el control sólo dieta (sin tratamiento), n = 9, agregando a 6.0 g de dieta/dosis en pequeñas placas de Petri (diámetro de 47 mm) individuales de plástico con tapa hermética. En un frasco se pesaron 30 g de dieta artificial y se suspendió cada toxina o el Biobit® a diversas concentraciones. Para el Biobit® se usaron 0, 19, 38, 76, 152.1, 304.3 y 608.7 IU/g. En cada frasco se colocaron 50 huevecillos de las colonias PIS o PIR. La actividad insecticida y la CL₅₀ se obtuvieron de acuerdo a la supervivencia analizada a los 10 d después de la exposición de larvas que eclosionaron de los huevecillos, para realizar el análisis estadístico Probit, empleando el programa de computación POLO-PC plus (LeOra, 2007).

Para las toxinas, la dieta fue hidratada mediante la aplicación de aproximadamente 600 L de cada solución/dosis, usando una micropipeta, para que la dieta quedara completamente

impregnada. Después de eso se infestó cada frasco con 16 huevos. Este experimento se realizó por triplicado, en experimentos independientes. Se observó la supervivencia a los 10 d después de la exposición para su análisis y se comparó con los controles no tratados (impregnando la dieta con agua estéril).

Las larvas de las colonias PIS y PIR que fueron expuestas se les agregó una concentración de 80 IU/g de Biobit®. Para las pruebas enzimáticas, moleculares y microbiológicas, la solución de la dosis fue añadida a 6.0 g de la dieta en pequeñas placas Petri (diámetro 47 mm) individuales de plástico con tapa hermética. La dieta fue hidratada mediante la aplicación de aproximadamente 500 μ L de Bt, usando una micropipeta, así pues quedando la dieta completamente impregnada. Después de eso se infestó cada caja Petri con 16 huevos, por triplicado. Se observó la supervivencia analizada a los 10 d después de la exposición para su análisis y se comparó con los controles no tratados. Después de seis meses de exposición a Bt para mantener el nivel de resistencia, se realizó un bioensayo de la actividad insecticida del Biobit® entre las colonias de ambas colonias previamente expuestas al mismo.

5.4 Bioensayo con Antibiótico

Inicialmente y para seleccionar la cantidad de antibiótico que toleraban los insectos se hizo un ensayo preliminar. En pequeñas cajas Petri (diámetro 47 mm) individuales de plástico con tapa hermética se pesaron 6 g de dieta estéril a las que se agregó gentamicina (G-1397, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en diversas concentraciones: 100 μ g, 300 μ g y 500 μ g + una mezcla de estreptomicina 100 μ + penicilina 200 μ (P-3539, Sigma-Aldrich) y se colocaron 20 larvas del 3er estadio de las colonias PIS y PIR y el control sin tratar, por duplicado, n= 16. Del día 0 al 7 se tomaron 3 larvas cada día y se les sacó el intestino medio. El intestino se homogenizó en 50 μ L de agua estéril en tubos Eppendorf estériles, se dio un pulso en vortex (Thermolyne Maxi Mix PlusTM Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IOWA USA), se centrifugó en la microcentrífuga (MiniSpin Eppendorf AG 22331 Hamburg, Alemania) por 4 min a una velocidad de 9,000 rpm; se tomaron 20 μ L del sobrenadante con una micropipeta (Eppendorf Research) y se sembró en agar nutritivo. Esto se realizó con ambas cepas y un control con dieta estéril, y se repitió del día 0 hasta el día 7, para observar la flora microbiana.

Para determinar la susceptibilidad de larvas de las dos colonias de *P. interpunctella* (PIS y PIR), al producto comercial Biobit® en combinación con antibióticos, se evaluó sólo una combinación de antibióticos (gentamicina 100 µL + una mezcla de estreptomicina 100µL+ penicilina 200µL) con tres concentraciones del Biobit®: 0 (control), 1000 y 2000 IU/g. Empleando las mismas cajas de 47 mm de diámetro se agregaron 6 g de dieta estéril a la que se agregó agua destilada (control), agua más la mezcla de antibióticos, Biobit® a 1000 IU/g, Biobit® a 2000 IU/g, Biobit® a 1000 IU/g+ antibióticos, Biobit® a 2000 IU/g+ antibióticos, para un total de seis tratamientos. Se cuidó que la solución total de que cada tratamiento fuera parte del volumen de agua requerida para la dieta, para que todas las cajas tuvieran el mismo contenido de humedad. En cada caja se colocaron 30 larvas del 3er estadio de cada cepa, por duplicado. Las cajas se incubaron bajo las mismas condiciones que la cría. El porcentaje de mortalidad se determinó por la diferencia de larvas vivas y muertas después de 7 d de incubación.

5.5 Obtención de intestino medio

Se obtuvieron larvas del quinto estadio larval de las colonias PIS y PIR de *P. interpunctella*, y se llevó a cabo la disección para la obtención del intestino medio de las mismas. Además se guardaron larvas de todos los estadios de ambas colonias (PIS y PIR) y se realizaron análisis de larvas completas. Posteriormente se almacenaron a 620°C para futuros análisis.

5.6 Actividad antibacteriana del contenido intestinal

Para calcular la actividad bactericida, se obtuvieron 20 intestinos de larvas de las colonias PIS y PIR, expuesta o no a Bt y se mezclaron con una micropipeta con 200 µL de agua estéril en tubos Eppendorf de 1-mL estériles, se dio 1 pulso en vortex y se centrifugaron por 3 min a 9,000 rpm en microcentrífuga. Al centrifugarse se separó el sobrenadante y se pasó a

otro tubo Eppendorf; los tubos con cada muestra se mantuvieron a temperatura ambiente en una gradilla hasta su uso.

En placas de agar Müeller Hinton (BIOXON, México) se colocan 400 μ L de las bacterias *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *E. coli* y *Serratia marscesens* cada una en distinta placa, las cuales se sembraron masivamente por duplicado, además de un control en el cual no se sembró nada (n=10). Se dejaron secar las placas de 20 a 30 min bocarriba; ya pasado el tiempo, se colocaron pequeños discos de papel filtro impregnado con el sobrenadante de cada cepa, preparado previamente. Las placas se incubaron por 24 h a 37°C y posteriormente se revisaron para ver si se formaron halos de inhibición alrededor de los discos, indicativos de actividad bactericida del contenido intestinal de cada cepa.

5.7 Identificación de genes por RT-PCR

Las secuencias de los oligonucleótidos se obtuvieron siguiendo la metodología reportada sobre flora de lepidópteros previamente (Matzuda *et al.*, 2007). Para lograrlo, se seleccionaron las secuencias de los genes ribosomales de la subunidad 23S para el grupo de Enterobacterias. Tales secuencias permiten amplificar secuencias provenientes de regiones internas del ARNm del gen seleccionado. También se seleccionó un gen como control interno (proteína ribosomal S7) (Fabrick *et al.*, 2003), el cual es un gen constitutivo de *P. interpunctella*. Las secuencias de nucleótidos se describen en la Tabla 1.

5.7.1 Extracción de ARN de intestino medio de *P. interpunctella*

Un grupo de tres intestinos medios de larvas de las colonias PIS y PIR de *P. interpunctella*, previamente macerados se homogenizaron con 1-mL de Trizol (Gibco BRL) para la extracción de ARN; el homogenizado se agitó por 30 seg en vortex y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de Trizol utilizado, después se agitó en vortex por 30 seg.

Posteriormente se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó (Centrifuga Eppendorf, Alemania) a 13,000 rpm/15 min. Para la obtención de ARN, se recuperó la fase

transparente del sobrenadante y se transfirió este contenido a otro tubo Eppendorf, al cual se agregaron 500 µL de isopropanol, se agitó por inversión suavemente e incubó a -20°C por 15 min. Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante, se lavó la pastilla de ARN con 1-mL de etanol al 75% con agua DEPC, se centrifugó 5 min a 13,000 rpm se eliminó el sobrenadante y quedó una pastilla la cual se dejó secar y después se resuspendió en 50 µL de agua DEPC. Se cuantificó inmediatamente o en caso de que no se cuantificara en ese momento, se guardó en un congelador a -70°C hasta su uso.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de flora intestinal de lepidópteros y hemolina en *P. interpunctella*

Grupo Bacteriano (referencia)	Gen	Oligonucleotidos	Fragmento
<i>Enterobacteriaceae</i> (Matsuda <i>et al.</i> , 2007)	23S ARNr	En-lsu3F.- TGCCGTA ACTTCGGGAGAAGGCA En-lsu3R.- TCAAGGCTCAATGTT CAGTGTC	428 pb
Proteína Ribosomal S7 (Fabrick <i>et al.</i> , 2003)	S7	F- ACAACAAGAAGTCAATCATCATCTA R- TTGTGCTCAATGGTGGTCTGTTG	880 pb
Hemolina (Faye y Kanost, 1998)	Hem	5´-ACCTTACAAA(CT)TGGA (AG)TGCCA-3´ an antisense primer: 5´- CACTGAC(AT)AC(AG) GTCAATTTCA-3´	810 pb

5.7.2 Cuantificación de ARN Total

Para la cuantificación del ARN total obtenido del intestino medio de larvas de las colonias PIS y PIR se tomaron 10 µg de ARN y se hizo una dilución 1:100, con 990 µL de agua DEPC y se llevó al espectrofotómetro (GeneQuant, Amersham) y se leyó a 230 nm de longitud

de onda, usando como blanco el agua DEPC. Los resultados obtenidos se obtuvieron en microgramos de ARN por microlitro ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

5.7.3 Tratamiento del ARN total con ADNsa

Se hizo un tratamiento del ARN para eliminar cualquier traza de ADN genómico que se pudiera encontrar en las muestras obtenidas de ARN total obtenido de los intestinos de insectos. Se utilizaron 5 μg de ARN obtenido del intestino medio extraído previamente y mantenido a -20°C , al cual se le agregó 1- L buffer de reacción, 1- L de enzima ADNsa (RQ1 ARNsa Free ADNsa, Promega) por cada microlitro de ARN, se aforó con agua inyectable a una reacción de 10 μL , se dejó incubando por 30 min a 37°C en un termomixer (Barnstead/Lab-Line Max Q 400 Dubuque, Iowa USA). Pasado el tiempo de incubación se agregó 1- L de la solución stop y se mezcló, para posteriormente incubar por 10 min a 65°C en un termomixer para inactivar la ADNsa.

5.7.4 Síntesis de ADNc a partir de ARN Bacteriano

Para la síntesis de la hebra de ADNc (complementario) a partir de ARN se llevó a cabo la reacción de RTóPCR con el kit de ImProm-III[®] Reverse Transcription System, Promega. Para ello, se adicionaron 10 μL de ARN obtenido del intestino medio de *P. interpunctella*, 2 μL del primer 3' de los oligos del gen blanco (23S enterobacteria, hemolina y S7); 8 μL de Nucleasa Free Water, 6 μL de Buffer de reacción 5X, 5 μL de MgCl_2 , 1- μL de t dNTP's Mix, 0.5 μL de la enzima Recombinant ARNsin, RT 1- μL esto para obtener reacciones de 30 μL ; la reacción se incubó a 42°C por 1-h y se inactivó la enzima a 65°C por 10 min.

5.7.5 Estandarización de RT-PCR

En este experimento se estandarizó la amplificación del gen constitutivo de *P. interpunctella*, la proteína ribosomal S7 que sirvió de control interno de expresión y el gen 23S para el grupo de Enterobacterias, para obtener la temperatura ideal donde los oligonucleótidos

alinean con su respectivo ADN complementario. Este experimento se desarrolló con larvas totalmente susceptibles y resistentes de *P. interpunctella* que no estuvieron expuestas a ningún tipo de bioinsecticida. Con el ARN extraído del intestino de las larvas, se obtuvo el ADNc correspondiente para cada gen que se amplificó, y una vez obtenido el ADN complementario, se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) de gradiente en un termociclador (Techne Touchgene Gradient, Inglaterra), donde se utilizaron 8 temperaturas con gradiente de 16°C. A continuación, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para ver la amplificación, teñidos con bromuro de etidio usando como buffer tris-acetato-EDTA (TAE) al 1X, utilizando marcador de peso de pares de bases el ADN 100 pb (Promega).

5.7.6 Análisis de la expresión de transcritos por RT-PCR

Para determinar si se expresaron los transcritos que codifican para el péptido antimicrobiano hemolina se diseñaron cebadores y se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen de 50 μ L, en presencia de 10 μ L de templado (ADNc), 29 μ L de agua inyectable estéril, 5 μ L de buffer de reacción 5X, 3 μ L de MgCl₂, 1- μ L de dNTP's Mix, 1- μ L de OLIGO 5' y 1- μ L de OLIGO 3' (para enterobacterias, hemolina y S7), 0.2 μ L de GoTaq; las muestras se amplificaron en un termociclador. La reacción de PCR se inició con una fase de desnaturalización inicial de 94°C por 1-min, 35 ciclos de 92°C por 1-min; la fase de alineamiento 53°C por 1-min, 72°C por 2 min y finalmente, una extensión final a 72°C por 7 min. Se tomaron 5 μ L de la reacción de PCR para observar la amplificación en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizó por medio de la tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta.

5.7.7 RT-PCR del ARN de intestino de larvas de P. interpunctella

Cuando ya se tuvo la temperatura de amplificación correspondiente de cada gen, que fue en el rango de 47-64°C en el caso del gen 23S para el grupo de Enterobacterias y de 40-50°C para el gen constitutivo de *P. interpunctella* la proteína ribosomal S7 (Kim *et al.*, 2008), se realizó un PCR con el kit GoTaq (Promega) del ADNc correspondiente para cada gen del

ARN extraído de los intestinos de las larvas expuestas y no expuestas a Biobit® de las colonias PIS y PIR, utilizando 10 μ L del ADNc, 29 μ L de agua inyectable estéril, 5 μ L de buffer de reacción 5X, 3 μ L de MgCl₂, 1- μ L de dNTP's Mix, 1- μ L de OLIGO 5' y 1- μ L de oligo 3' (para Enterobacterias, hemolina y S7), 0.2 μ L de GoTaq para obtener reacciones de 50 μ L (Kim *et al.*, 2010). Después se colocaron los tubos en un termociclador a una temperatura de desnaturalización 94°C por 4 min, a 35 ciclos de 92°C por 30 seg. Las temperaturas para el gen S7 fueron: 44°C por 45 seg, 72°C por 1-min y extensión final de 72°C por 5 min; para el gen 23S fueron: 94°C por 4 min, a 35 ciclos de 92°C por 1-min, 47-64°C por 1-min, 72°C por 2 min y extensión final de 72°C por 7 min. Se tomaron 5 μ L de la reacción de PCR para observar la amplificación en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizó por medio de la tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta comparado con un marcador de peso molecular (ADN ladder 100 pb).

5.8 Actividad Enzimática

Sobre hielo se obtuvieron 12 intestinos de larvas de las colonias PIS y PIR de *P. interpunctella*, expuesta o no a Bt, por separado. Los intestinos se mezclaron con una micropipeta con 100 μ L de agua estéril en tubos Eppendorf de 1-mL estériles, se dio 1 pulso en vortex y se centrifugaron por 3 min a 9,000 rpm en una microcentrífuga refrigerada (Beckman Coulter Microfuge^R R Centrifuge, Alemania) a 4°C. Al centrifugarse se separó el sobrenadante y se guardó en otro tubo Eppendorf estéril; los tubos con el sobrenadante así obtenido se colocaron en hielo hasta su uso, o se mantuvieron en congelador a -70°C. Se preparó un gel de SDS-PAGE al 10% mezclando 2.0 mL de agua destilada, 1.7 mL de Acrilamida al 30%, 1.3 mL de Tris 1.5M pH 8.8, 50 μ L de SDS al 10%, 50 μ L de APS al 10% y 2 μ L de TEMED esto para el gel. Para el stock son 680 μ L de agua destilada, 170 μ L de acrilamida al 30%, 130 μ L de Tris 1.0M pH 8.8, 10 μ L de SDS al 10%, 10 μ L de APS al 10% y 1- μ L de TEMED) en una cámara vertical (Dual Mini Gel) con placas de 10 x 11.3 x 0.75 cm con capacidad para 10 muestras por gel al polimerizar el gel se utilizaron Tris Glicina EP IX (18 g glicina, Tris 3.75 g y 1.25 g de SDS para 1-L) como buffer de corrida, se retiraron los peines y se añadió solución de lisis sin β -mercaptofenol en cada pozo para que sean visibles. Después se tomaron 10 μ L de

cada muestra para cargar el gel con una micropipeta y por último el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope BIORAD 250 KD). La cámara se conectó a una fuente de poder (Labnet Internacional Edison Power Station, New Jersey) con un voltaje de 110 V y una intensidad de 15 mA por 20 min y después se subió a 20 mA por 40 min, se utilizó un baño de recirculación para mantener la temperatura a 4°C. Se corrieron los dos geles con las mismas muestras (PIR, PIR expuesta a Bt, PIS) de los cuales fueron para:

- 1) *Activity Blots* en los cuales se observó la actividad usando un compuesto tipo quimiotripsina (S-7388, N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide; Sigma-Aldrich) (SAAPFpNA);
- 2) *Activity Blots* contra un compuesto tipo tripsina (B3279, N- α -Benzoyl-arginine-p-nitroanilide, Sigma-Aldrich) (BApNA);
- 3) Zimogramas con el gel Cry indicador.

Los geles se tiñeron con azul Comasiie.

5.8.1 Análisis de la actividad enzimática mediante transferencia (Activity blots)

Cuando faltaban 5 min antes de terminar la corrida de las muestras en el gel SDS-PAGE, en tubos Eppendorf de 0.5 mL se agregaron 300 μ L de Tris 0.2 M con pH 8.8 en dos tubos y 8 μ L de SAAPFpNA en uno y en el otro 8 μ L de BApNA, se conservaron en hielo hasta su uso. Se recortaron 2 membranas de nitrocelulosa más o menos del tamaño del gel, después cada membrana fue puesta en pequeños recipientes con cuidado y utilizando pinzas, se moja completamente una membrana con BApNA y la otra membrana con SAAPFpNA, evitando la formación de burbujas. Al salir los geles de la corrida, se recortaron y se colocan sobre las membranas por 15 min a temperatura ambiente. Al pasar este tiempo se retiraron los geles de la membrana y se dejaron tiñendo toda la noche a temperatura ambiente, en otro recipiente con solución colorante compuesta de 0.1% de azul de Comassie, metanol, ácido acético y agua destilada en una proporción 40:10:50 respectivamente y se colocaron en un agitador orbital con temperatura (MaxQ 4000 Barnstead/Lab-Line max Q 4000, Dubuque Iowa USA). Para revelar las bandas que fueron teñidas con azul de Comassie, se utilizó una solución decolorante formada por metanol, ácido acético y agua destilada en una proporción (40:10:50) la cual se dejó de 3 a 6 h, en caso de que se haya observado muy clara la tinción, se deja más tiempo. Se observaron y compararon las bandas con el marcador de peso molecular

(Precision Plus Protein Standards Keleidoscope BIORAD 250KD) para definir el peso relativo de los transcritos amplificados.

Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con 0.5 g nitrato de sodio (NaNO_3), que se diluyeron en 50 mL de HCl 1N al 0.1%. Esta mezcla se añadió a los geles por 5 min, al pasar este tiempo se tiró la solución y se preparó sulfamato de amonio ($\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$) diluyendo 0.25 g en 50 mL de HCl 1N al 0.1%, mezcla que se dejó en agitación por 5 min, se decantó nuevamente la solución y por último se preparó N-(1-naftil) etil-N-diamina al 0.05%, para lo cual se pesaron 0.02 g y se diluyeron en 25 mL de agua destilada y 25 mL de etanol al 70%, esta solución se agregó a los geles y se dejó de 30 a 60 seg, se decantó y se observaron las bandas teñidas.

5.8.2 Zimogramas

Para los zimogramas se preparó un gel indicador en placas de 10 x 11.3 x 0.75 cm, se mezclaron 2 mL de acrilamida al 30%, 2 mL de Tris 1.5M (pH8.8), 1-mL de Cry1AC, 20 L de APS al 10% y 2 L de TEMED y se incubó para esperar la reacción de polimerización. Al salir el gel de corrida, inmediatamente se recortó y se colocó sobre el gel indicador con Cry, se incubó de 3 a 4 h a 37°C; ya que terminó el tiempo de incubación, se puso en un recipiente con solución colorante compuesta de 0.1% de azul comassie, metanol, ácido acético y agua destilada en una proporción 40:10:50, respectivamente. Se dejó durante toda la noche en un agitador orbital con temperatura. Para revelar zonas claras de hidrólisis se utilizó una solución decolorante formada por metanol, ácido acético y agua destilada en una proporción 40:10:50 la cual se dejó en agitación de 1-4 h, pero en caso de que se observara una tinción muy fuerte, se dejó por más tiempo para obtener bandas más definidas.

5.9 Aislamiento y cultivo de bacterias

Todos los medios de cultivo utilizados fueron de BIOXON, México. Las excepciones se muestran en el Anexo --

A) Anaerobias

Primero se obtuvieron 10 intestinos medios de larvas de las colonias PIS y PIR de *P. interpunctella*, y el contenido se tomó con una micropipeta eppendorf de 100 μ L, para que no quedaran residuos de intestinos se agregó un poco de agua estéril para después vaciar el contenido en tubos Eppendorf, se homogenizó con 100 μ L de agua estéril, se dio un pulso en vortex y se centrifugaron por 4 min a 9,000 rpm en microcentrifuga (Mini Spin Eppendorf AG 22331 Hamburgo, Alemania). Al centrifugarse se separó el sobrenadante y se pasó a otro tubo Eppendorf, para inocularlo en caldo tioglicolato de sodio y en caldo infusión cerebro corazón; posteriormente se colocaron en una jarra del sistema anaeróbico BBL Gaspak 100 system, con el uso de un sobre Gaspak EZ Anaerobe Container System el cual generó un ambiente anaerobio y de gaspak Dry Anaerobic Indicador Strips, se incubó a 37°C observamos si había crecimiento a las 24 h. Si no había crecimiento, se dejaban de 3-5 días más, antes de descartar la presencia de bacterias anaeróbicas. En caso de observar crecimiento microbiano, una vez transcurrido el tiempo de incubación se tomó una asada de cada medio y se inoculó una pequeña cantidad de caldo del cultivo en cajas de agar soya tripticasa extendiéndose por estría cruzada para procurar obtener colonias aisladas. Igualmente se colocaron dentro de la jarra para anaerobiosis, conteniendo un sobre generador de Gaspak con una tirilla indicadora redox, y se incubó a 37°C de 3 a 5 d.

Ya realizado el aislamiento de bacterias anaerobias, a las colonias representativas se les realizó la tinción de Gram para observar la morfología celular y clasificar si eran Gram-positivas o negativas. Después de clasificarlas se realizaron prueba bioquímicas para su identificación.

B) Aerobias

De igual manera se obtuvieron 10 intestinos de los cuales se extrajo el contenido intestinal con una micropipeta Eppendorf de 100 μ L, y para que no quedaran residuos de intestinos, se agregó un poco de agua estéril, para después colocarlos en tubos Eppendorf. Las muestras se homogenizaron en 100 μ L de agua estéril, y se dio un pulso en vortex, los tubos con todas las muestras se centrifugaron por 4 min a 9,000 rpm en una microcentrifuga. Al centrifugarse, se separó el sobrenadante y éste se pasó a otro tubo Eppendorf, para inocularlo con caldo infusión cerebro corazón. Los tubos con todas las muestras se incubaron a 37°C por

24 h y al observar turbidez presente en los mismos, se tomó una pequeña muestra de caldo del cultivo y se sembró con una asa bacteriológica en cajas de agar nutritivo extendiéndose por estría cruzada y se obtuvieron colonias aisladas después de incubar las cajas a 37°C por 24 y 48 h. A las colonias representativas obtenidas, se les realizó una tinción de Gram, para observar la morfología celular y clasificarlas como Gram-positivas o negativas. Después de clasificarlas se realizó la prueba de oxidasa, como se describe a continuación.

5.9.1 Prueba de Oxidasa

De las colonias representativas, con un asa se tomó una colonia y se colocó en un papel filtro estéril, y se le agregó una gota del reactivo de oxidasa (Oxidase Becton, Dickinson and Company, Lot. 8234895) y se reportaron como resultado positivo, si la coloración era azul y negativo si no cambiaba de color.

5.9.2 Identificación de Bacterias anaerobias y aerobias con Microplacas BIOLOG

5.9.2.1 Aislamiento en un medio de cultivo apropiado.

- Para obtener un aislamiento y cultivo puro se recomienda utilizar un medio de agar. Para el aislamiento de aerobias se empleó el agar nutritivo y para anaerobias el agar soya tripticasa, ambos de BIOXON. Todos los medios ya inoculados se incubaron a 30°C ó 35-37°C +/- CO₂ en base a si se requerían o no condiciones de anaerobiosis. Todas las colonias aisladas se identificaron con el sistema de microplacas GN2, siguiendo los lineamientos que se muestran en la Tabla 2. En base a los resultados, los microorganismos después se inocularon en los medios agar sangre (agar con 5% de sangre de cordero), agar chocolate, agar azul de metileno eosina (BUG+B) o en el medio de cultivo de hierro triple-azúcar (TSI).

5.9.2.2 Preparación y caracterización de cada colonia aislada.

Al ya tener aisladas las colonias, se realizó la tinción Gram para determinar si eran cocos o bacilos. Después se caracterizó a la bacteria o bacterias dentro de un grupo ya sea: no entéricos (GN-NENT), entérico (GN-ENT), o fastidiosos (GN-FAS). Esto nos ayudó a

determinar si los procedimientos eran los adecuados para el cultivo de la bacteria y seleccionar la preparación del inóculo.

- Protocolo de GN-NENT si: a) la bacteria fue oxidasa positiva o b) la bacteria fue oxidasa negativa y en el medio de cultivo TSI mostró un pico alcalino/fondo alcalino o pico alcalino/fondo ácido. Incubar las placas a 30°C ya que estas bacterias generalmente crecen mejor a esta temperatura.
- Seguir con el protocolo GN-ENT si: la bacteria es oxidasa negativa, y da en el medio de cultivo TSI pico ácido/fondo ácido o pico alcalino/fondo ácido. Incubar las placas entre 35-37°C ya que estas bacterias generalmente crecen mejor en este rango de temperatura.
- Seguir con el protocolo GN-FAS si: a) las bacterias necesitan agar chocolate o 6.5% de CO₂ para crecer, o b) el crecimiento es muy pobre en agar BUG+B, formando colonias con punta de alfiler. Estas bacterias generalmente crecen mejor entre 35-37°C. La mayoría de bacterias GN-FAS (*Actinobacillus*, *Alysiella*, *Brucilla*, *Capnocytophaga*, CDC grupo DF-3, CDC GRUPO EF-4, *Eikenella*, *Haemophilus*, *Kingella*, *Moxarella*, *Neisseria*, *Simonsiella*, *Sutonella* y *Taylorella*) son aisladas de el tracto respiratorio de mamíferos.

El crecimiento de la bacteria utilizando las condiciones recomendadas y la elección del medio de agar es muy importante ya que debe apoyar el crecimiento y promover la conservación de la actividad metabólica completa, que corresponda a los patrones metabólicos en la base de datos GN. Las células deben de cultivos frescos, ya que muchas colonias pierden viabilidad reducen su vigor metabólico al entrar a la fase estacionaria de crecimiento. El período de incubación recomendado para la mayoría de los organismos es 4 a 24 h. Si se obtenía un crecimiento insuficiente para inocular el panel, se aislaba en una o varias placas de agar, e incubaba de 4 a 48 h. Excepciones y detalles de estos protocolos se muestran en el anexo 1.

5.9.2.3 Preparación del Inóculo

- Establecer el rango aceptable de turbidez en el turbidímetro. Primero, se estableció el ajuste de transmitancia al 100% usando un tubo limpio, sin inocular para GN. Después, se determinó la turbidez deseada para el tipo de Gram-negativas, con la turbidez estándar (GN-NENT o GN-ENT y GN-FAS). Utilizamos el turbidímetro Biolog y los

tubos de diámetro 20 mm y obtuvimos niveles de transmisión de alrededor de 61% (GN-ENT), 52% (GN-NENT) y 20% (GN-FAS) respectivamente. Nota: Estas lecturas pueden variar ligeramente en diferentes turbidímetros Biolog.

- Turbidímetro en blanco (transmitancia =100%) para obtener esta transmitancia se utilizó un tubo limpio y que tuviera la solución inoculadora de GN/GP-IF. Los tubos usados no son uniformes ópticamente, así que utilizamos un blanco individualmente y no debemos rotar el tubo en camino de la luz del turbidímetro.
- Si nuestras bacterias pertenecen al grupo GN-ENT y GN-FAS agregamos tioglicolato de sodio (5 mM) a los tubos con solución inoculadora GN/GP-IF. Esto puede hacerse añadiendo precisamente 3 gotas de una ampolleta que contiene una solución concentrada de tioglicolato de sodio. El tioglicolato es un agente anti-cápsula e inhibe parcial o totalmente el color púrpura en el pozo A-1 y otros pozos se pueden formar negativos cuando las bacterias se comen sus cápsulas de polisacáridos como fuente de carbono. El tioglicolato también es agente reductor que mejora las reacciones para las cepas débiles así como para las bacterias GN-FAS. Algunas especies de GN-NENT (forman fuertemente un pigmento amarillo/naranja) también puede requerir tioglicolato. Observar tabla 2 para detalles de las especies.

Posteriormente se reparó una suspensión uniforme, removiendo células de la placa de agar con un hisopo estéril con el fin de no arrastrar nutrientes del agar a la suspensión. Iniciamos con colonias aisladas para luego ir a las zonas de crecimiento más denso si es necesario. Giramos y presionamos el hisopo contra la superficie interior del tubo de vidrio seco, por encima de la línea de líquido para disolver grumos y que las células se liberaran. Movimos el hisopo arriba y abajo de la pared del tubo hasta que el organismo se mezclara con el líquido y se convirtiera en una suspensión homogénea, sin grumos. Si los grumos estaban todavía presentes, dejamos reposar el tubo durante varios minutos y permitimos que se asentara en el fondo.

- Ajuste de la densidad del inóculo: ver como la aguja del medidor se dirige hacia el rango aceptable de turbidez. El rango aceptable se define por el estándar de turbidez más o menos de 2% de transmitancia. Esto debe hacerse con precisión, ya que establece la concentración oxígeno para las células y para la química de óxido-reducción. La

densidad puede ser moderada mediante la adición de más fluido de inoculación (para bajar la densidad) o la adición de más células (para elevar la densidad).

- Inocular la suspensión celular en la microplaca rápidamente en no más de 20 min, en la inoculación de fluido sin nutrientes.

5.9.2.4 Inoculación de la Microplaca

- Etiquetamos la microplaca con el nombre del organismo, vertimos la suspensión celular en el depósito de una pipeta multicanal, para hacerlo más rápido utilizamos 8 puntas estériles con una pipeta de 8 canales de repetición, al llenar las puntas, comprobamos que todas estén llenadas por igual, si no, repite el proceso. Rellenamos todos los pozos, precisamente, con 150 μ L, cuidado de no salpicar de un pozo a otro. Continuamos rellenando y cuando el nivel de líquido en las puntas se acabó, se volvió a llenar y distribuir en los pocillos restantes. Después de inocular el líquido se formó un gel suave, y por último cubrimos la microplaca con su tapa.

5.9.3 Incubación

- Incubamos la microplaca con las mismas condiciones que resultaron ser el mejor para la bacteria en el paso 1 y 2.
- Proporcionamos una fuente de humedad en la incubadora para ayudar a minimizar la deshidratación exterior de los pozos de la microplaca, colocamos un recipiente de plástico con toallas de papel mojado en el fondo; incubamos las placas de 4-6 h y/o por la noche (16-24 h).

El resumen de todos los experimentos y tratamientos realizados con ambas colonias se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos y análisis realizados con las colonias de *P. interpunctella* susceptible (PIS) y resistente (PIR) de *P. interpunctella* a *Bacillus thuringiensis*, así como la generación en la que se realizaron.¹

Determinación, generación (F)	Tratamientos				
Actividad Insecticida de toxinas y productos de <i>Bt</i> (CL_{50}), larvas del segundo estadio, F1 ²	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1F	DiPel®	
Actividad Insecticida (CL_{50}), larvas del primer estadio, F4	Biobit® DF				
Porcentaje de mortalidad dosis única, larvas del primer estadio, F8	Biobit®, 100 UI/g				
Actividad Insecticida (CL_{50}), larvas del primer y tercer estadio, F16	Biobit®				
Porcentaje de mortalidad dosis única, larvas del segundo al quinto estadio, F18	Biobit®, 1000 UI/g	Biobit®, 2000 UI/g	Biobit®, 1000 UI/g + antibiótico ³	Biobit®, 2000 UI/g + antibiótico	Antibiótico
Actividad enzimática, larvas del 2do y 5to estadio sin exponer, F6	Activity blot hidrólisis de BApNA		Activity blot hidrólisis de SAAPFpNA		Zimograma, hidrólisis de caseína
Actividad enzimática, larvas del 4to estadio, F18, expuestas a DiPel® 500 UI/g, y/o antibióticos	Activity blot hidrólisis de BApNA		Activity blot hidrólisis de SAAPFpNA		Zimograma, hidrólisis de caseína
Actividad antibacteriana del jugo gástrico, larvas del 5to estadio, F5	<i>Serratia marcescens</i>		<i>Escherichia coli</i>		
RT-PCR gen constitutivo S7, larvas de 5to estadio (F14 y consecutivas)	Biobit®, 500 UI/g				
RT-PCR gen de hemolina, larvas de 5to estadio, F18	Biobit®, 500 UI/g				
RT-PCR 23S (<i>Enterobacteriaceae</i>), larvas de 5to estadio, F18	Biobit®, 500 UI/g				
Aislamiento de Bacterias, larvas de 5to estadio, F20, sin exponer o expuestas al Biobit 500 UI/g	Aerobias		Anaerobias		
Identificación de bacterias por Biolog GN2 del experimento anterior	Aerobias		Anaerobias		

¹Se incluyeron controles sin tratar en todos los experimentos

²Datos proporcionados por el USDA-Manhattan, KS, USA

³Antibióticos (gentamicina 100 µL + una mezcla de estreptomycin 100µL+ penicilina 200µL) en 6 g de dieta.

6. RESULTADOS

6.1 Actividad insecticida

Como se describió antes, las dos colonias de *P. interpunctella* evaluadas en este trabajo provenían del laboratorio de la Oppert (USDA, Manhattan, KS). En este laboratorio se realizaron los bioensayos con diferentes toxinas Cry de Bt además de contra el DiPel®, observándose mayores radios de resistencia con las toxinas (66, 237 y más de 80 con Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F, respectivamente) comparado con el formulado comercial (10.1) (Tabla 3) de las dos colonias, considerando que fueron los insectos de la primera generación (F1).

Tabla 3. Actividad insecticida medida como concentración letal media (CL₅₀) de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac o Cry1F, o del formulado comercial DiPel® (µg/g) de *Bacillus thuringiensis*, contra larvas del segundo estadio de dos colonias de *Plodia interpunctella*.¹

Colonias de <i>Plodia interpunctella</i>	Concentración letal media (µg/g)			
	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1F	DiPel®
PIS	0.008 (0.003-0.015)	0.008 (0.002-0.021)	8.30 (5.70-13.2)	1.35 (0.36-2.45)
PIR	0.51 (0.21-0.92)	1.90 (1.12-3.16)	>700	13.6 (7.45-21.0)
Radio de Resistencia	66.0 (31.0-140)	237 (82.1-686)	>80.0	10.1 (4.22-24.2)

¹ En paréntesis se muestran los intervalos de confianza al 95%.

Valores obtenidos mediante el análisis probit, usando el programa Polo-PC plus.

Durante la etapa de establecimiento de las dos colonias en nuestro laboratorio, los insectos no se expusieron a ninguna toxina o producto a base de Bt, pues se pretendía evitar que la población se redujera de forma significativa. Ambas colonias se mantuvieron en dieta artificial sin Bt y las exposiciones se realizaron únicamente para realizar los bioensayos, es decir, no se mantuvo el esquema de exposición continua para ejercer una presión de selección de resistencia del insecto a Bt.

De cualquier forma, después de tres generaciones y ya que las colonias se habían establecido se evaluó su susceptibilidad al Biobit® de la población F4 en un bioensayo de dosis respuesta, usando el método de incorporación a dieta a base de trigo y avena. Los resultados de mortalidad se analizaron por el método de Polo-PC plus, calculando una CL_{50} de 56 UI/g (intervalos de confianza al 95% $[IC_{95}] = 28.7-88.2$ UI/g, $X^2 = 5.5$, pendiente = 1.9, y error estándar = 0.3) para la cepa susceptible (PIS), y una CL_{50} de 197 UI/g ($IC_{95} = 150.6-376.6$ UI/g, $X^2 = 4.0$ pendiente = 1.7, y error estándar = 0.23) para la resistente (PIR).

En ensayos posteriores, larvas de de la generación F8 se volvieron a exponer a una concentración intermedia a la CL_{50} determinada para ambas colonias en la F4, evaluando 100 UI/g. Los resultados mostraron diferencias significativas entre ambas, en base a los valores de la desviación estándar, como se observa en la Fig. 3.

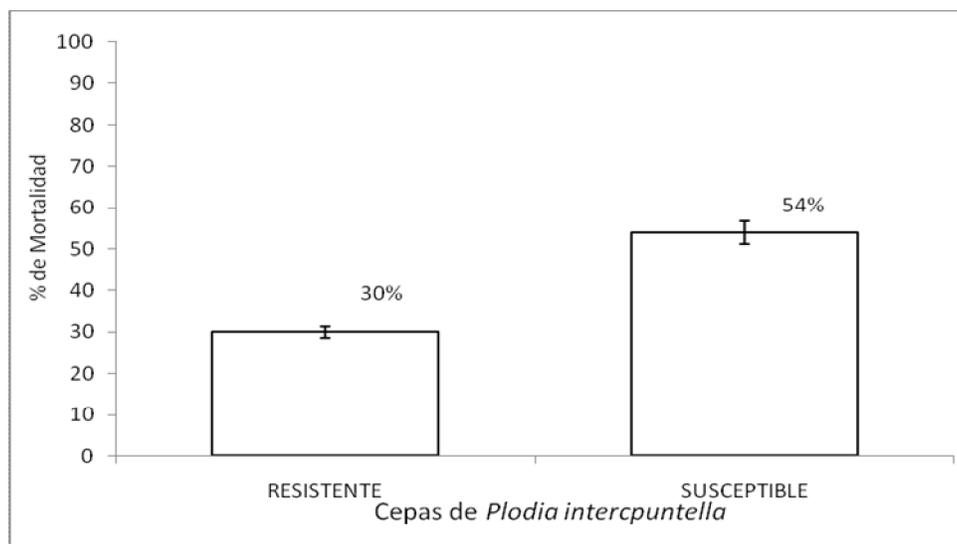


Fig. 3. Actividad Insecticida del Biobit® contra larvas del segundo estadio de dos colonias de *Plodia interpunctella* de la generación F8 expuestas a 100 UI/g, usando un bioensayo de incorporación a dieta. Los resultados son el promedio de tres repeticiones. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar.

En un estudio previo realizado en el laboratorio, al evaluar la relación en los cambios de susceptibilidad a Bt durante el desarrollo larvario de lepidópteros, se determinó que la susceptibilidad de la colonia PIS era significativamente diferente entre larvas del primer y tercer estadio larvario (Valadez-Lira *et al.*, 2012). Por este motivo nosotros decidimos realizar en bioensayo adicional para comparar la actividad insecticida del Biobit® entre larvas del

primer y tercer estadio larvario de las colonias PIS y PIR, ya que habían pasado 12 generaciones sin exponer al Biobit® (F16). En este bioensayo nosotros observamos que mientras las larvas de primer estadio seguían mostrando diferencias significativas en cuanto a susceptibilidad al Biobit®, en base a los límites de los intervalos de confianza, no se observaron diferencias entre larvas del tercer estadio larvario (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad insecticida medida como concentración letal media (CL₅₀) del formulado comercial Biobit® (UI/g) de *Bacillus thuringiensis*, contra larvas del primer y tercer estadio de dos colonias de *Plodia interpunctella*.¹

Colonias de <i>Plodia interpunctella</i>	CL ₅₀	IC ₉₅	X ²	Pendiente	Error estándar
PIS, 1er estadio	74.7	59.5-140.5	1.1	1.1	0.22
PIS, 3er estadio	247.5	116.5-363.7	1.0	0.9	0.30
PIR, 1er estadio	176.6	154.4-422.8	1.4	1.2	0.19
PIR, 3er estadio	501.8	279.5-949.2	0.9	1.0	0.33

¹ PIS = susceptible; PIR = resistente; IC₉₅ = intervalos de confianza al 95%. Valores obtenidos mediante el análisis probit, usando el programa Polo-PC plus. Los valores de error estándar son de la pendiente.

6.2 Actividad antibacteriana del contenido intestinal de *P. interpunctella*

Al evaluar la actividad bactericida del contenido intestinal de ambas colonias, se observó la inhibición de las bacterias *S. marcescens* y *E. coli* con los discos humedecidos con el contenido de la PIR sin exponer o expuesta al Biobit® sólo para *E. coli* y PIS expuesta al Biobit® para *S. marcescens*, como se observa en la Fig. 4.

6.3 Expresión de Transcritos por RT-PCR

6.3.1 Expresión de S7 y Hemolina

Para confirmar que la muestra y el proceso fueran los correctos, inicialmente se procedió a detectar el gen constitutivo S7, por medio de la amplificación del transcrito correspondiente. Los resultados mostraron que se expresó en las diferentes colonias de *P. interpunctella*, expuestas o no al Biobit® (Fig. 5).

Al analizar la amplificación del transcrito de hemolina del ARN de muestras provenientes de larvas completas o sólo del intestino de las diferentes colonias de *P. interpunctella*, sólo se observó la amplificación de muestras de la colonia PIR, expuesta o sin exponer al Biobit®, tanto de larvas completas como de intestinos (Fig. 6).

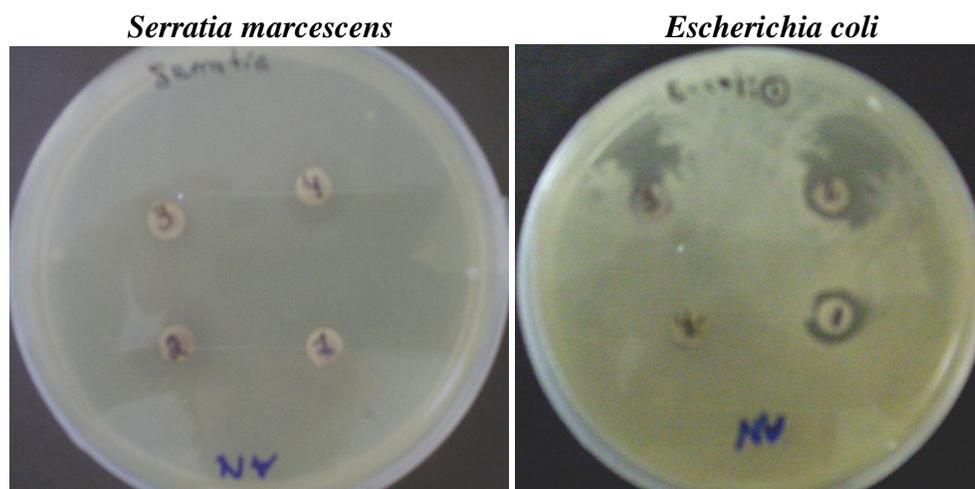


Fig. 4. Actividad inhibitoria del contenido intestinal de larvas del 4to estadio de cuatro colonias de *Plodia interpunctella*; 1= colonia resistente (PIR) sin exponer al Biobit®; 2 = colonia susceptible sin exponer al Biobit®; 3 = colonia resistente (PIR) expuesta al Biobit®; 4 = colonia susceptible expuesta al Biobit®.

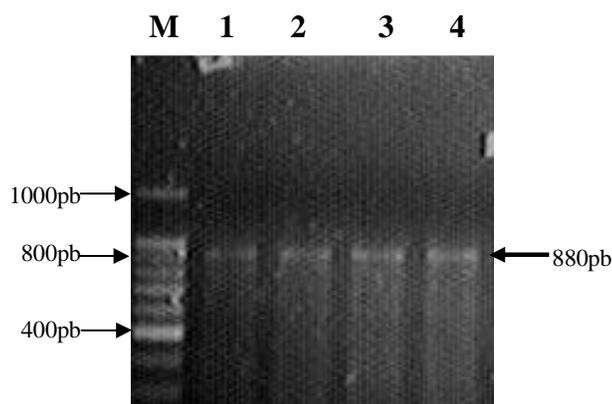


Fig. 5. Gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de amplificación correspondientes al gen constitutivo S7 (de aproximadamente 880pb) del ARN ribosomal de *Plodia interpunctella*. Las larvas de ambas colonias permanecieron sin exponer a excepción del caso de bioensayos. Resultados realizados con la F14. Carriles: M= marcador molecular; 1= larva completa de la colonia resistente (PIR) sin exponer al Biobit®; 2 = larva completa de la colonia susceptible (PIS) sin exponer al Biobit®; 3 = larva completa de la colonia PIR expuesta al Biobit®; 4 = larva completa de la colonia PIS expuesta al Biobit®.

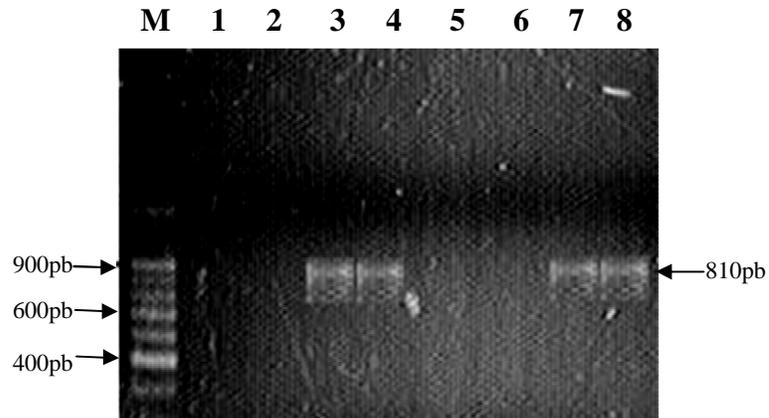


Fig. 6. Gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de amplificación correspondientes al gen transcrito del péptido antimicrobiano hemolina (de aproximadamente 810pb) del ARN ribosomal de *Plodia interpunctella*. Las larvas de ambas colonias permanecieron sin exponer a excepción del caso de bioensayos. Resultados realizados con la F18. Carriles: M= marcador molecular; 1= larva completa de la colonia susceptible (PIS) sin exponer al Biobit®; 2= larva completa PIS expuesta; 3= larva completa de la colonia resistente (PIR) sin exponer; 4= larva completa de PIR expuesta; 5= intestino de larva de la colonia susceptible (PIS) sin exponer; 6= intestino de larva PIS expuesta; 7= intestino de larva de la colonia resistente (PIR) sin exponer; 8= intestino de PIR expuesta.

6.4 Actividad Enzimática

Para determinar si las diferencias en la susceptibilidad al Biobit® y toxinas Cry de Bt se debían a cambios en la actividad enzimática, se realizaron análisis de *activity blot* y zimogramas. Como se habían observado diferencias en la susceptibilidad al Biobit® entre larvas susceptibles y resistentes, donde las susceptibles variaban según el estadio larvario (Tabla 4), en este experimento nosotros decidimos comparar la actividad entre larvas de diferentes estadios. Debido a que el tamaño de las larvas de *P. interpunctella* del primer estadio son muy pequeñas, se seleccionaron larvas del segundo y quinto estadio larvario. Los resultados del *activity blot* usando BApNA (tipo tripsina) o SAAPFpNA (tipo quimiotripsina) y de zimograma para actividad enzimática en membranas cargadas con caseína, se muestran en la Fig. 7. Los resultados de todos los estudios se resumen en la Tabla 5.

En general, al evaluar la actividad enzimática contra BApNA se observó sólo una banda de Mf~33.8 kDa, de mayor intensidad con la muestra de larva del quinto estadio de PIS (carril 3, Fig. 7A). Por el contrario, al evaluar la actividad enzimática en SAAPFpNA se observaron muchas diferencias. Entre las diferencias más notables que se pudieron observar que las

muestras con intestino de larvas sin exponer al Biobit® de la colonia PIS mostraron sólo dos bandas de ~26.6 y 42.2 kDa, tanto para larvas del segundo como del quinto estadio (carriles B2 y B4). Por el contrario, el jugo gástrico de larvas de larvas expuestas al Biobit® de la colonia PIR el patrón de proteasas contra SAAPFpNA varía al comparar la edad de la larva, ya que el carril correspondiente a muestra con las larvas del segundo estadio presentó tres bandas de Mf ~25.7, 38 y 42.8 kDa (carril B1), mientras que el carril cargado con muestras provenientes del jugo gástrico de larvas del quinto estadio presentaron solo dos zonas de actividad proteolítica de Mf ~25.7 y 42 kDa, pero no presentó la de ~38 kDa, además de que se observaron bandas adicionales de ~60 y 75 kDa (carril B3). Con respecto a la actividad caseinasa evaluada por medio de un zimograma, no se encontraron diferencias en el contenido intestinal de larvas entre las colonias PIS o PIR de *P. interpunctella* ni del tamaño de la larva a muestrear. Lo interesante de este bioensayo fue que se observaron únicamente dos bandas correspondientes a actividad de proteasas que hidrolizan la caseína, una del mismo tamaño que la observada en el ensayo de *activity blot* de ~33.8 kDa contra BApNA, y la de ~25.7 kDa que se aprecia con SAAPFpNA (Fig. 7C; Tabla 5).

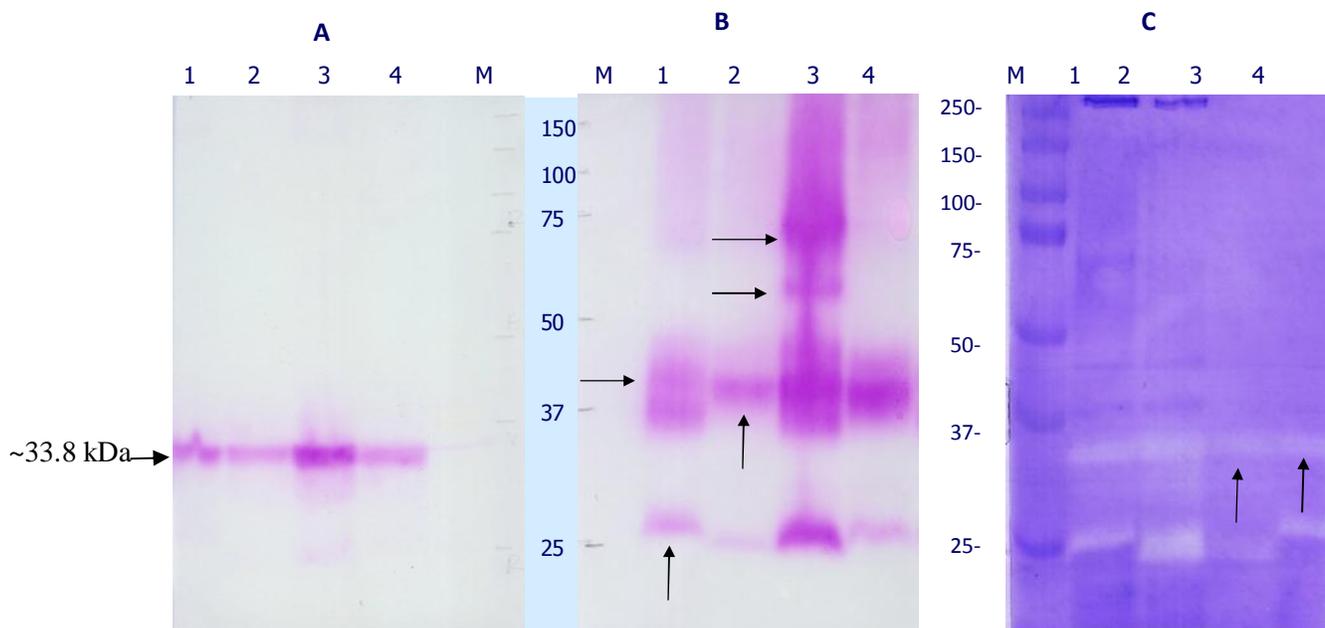


Fig. 7. Resultados del análisis enzimático mostrando actividad hidrolítica de dos colonias de *Plodia interpunctella* en base a su susceptibilidad a Bt: A) *activity blot* contra BApNA; B) *activity blot* contra SAAPFpNA; y C) zimograma contra caseína. Carriles: M= marcador molecular; 1= larva del segundo estadio de la colonia resistente (PIR); 2= larva del segundo estadio de la colonia susceptible (PIS); 3= larva del quinto estadio PIR; 4= larva del quinto estadio de PIS. Las larvas de ambas colonias permanecieron sin exponer a excepción del caso de bioensayos. Resultados realizados con la F6.

Tabla 5. Actividad enzimática observada por análisis *activity blot* y zimogramas del jugo gástrico de dos colonias de *Plodia interpunctella*, una susceptible (PIS) y otra resistente (PIR) a *Bacillus thuringiensis* y observadas contra BApNA (tipo tripsina), SAAPFpNA (tipo quimiotripsina) o caseína

Colonia, estadio-generación/tratamiento ¹	Número (tamaño de las zonas o bandas de hidrólisis en base al factor de migración, Mf en kDa)		
	BApNA	SAAPFpNA	Caseína
PIR, 2do estadio-F6/ sin exponer	1 (~33.8)	3 (~25.7, 38 y 42.8)	2 (~25.7 y 33.8)
PIS, 2do estadio-F6/ sin exponer	1 (~33.8)	2 (~25.7 y 42)	2 (~25.7 y 33.8)
PIR, 5to estadio-F6/ sin exponer	1 (~33.8)	5 (~25.7, 38, 42.8, 60 y 75)	2 (~25.7 y 33.8)
PIS, 5to estadio-F6/ sin exponer	1 (~33.8)	2 (~25.7 y 42)	2 (~25.7 y 33.8)
PIS, 4to estadio-F18/DiPel ² + antibióticos ³	1 (~33.8)	2 (~33.8 y 42)	1 (~33.8)
PIS, 4to estadio-F18/antibióticos ³	1 (~33.8)	1 (~33.8)	4 (~25.7, 37, 42 y 48.5)
PIS, 4to estadio-F18/DiPel ²	1 (~33.8)	2 (~33.8 y 42)	4 (~25.7, 37, 42 y 48.5)
PIS, 4to estadio-F18/sin exponer	1 (~33.8)	2 (~33.8 y 42)	ND
PIR, 4to estadio-F18/DiPel ² + antibióticos ³	1 (~33.8)	1 (~ 42)	1 (~33.8)
PIR, 4to estadio-F18/antibióticos ³	ND	ND	2 (~37 y 42)
PIR, 4to estadio-F18/DiPel ²	2 (~33.8 y 37)	2 (~33.8 y 42)	2 (~37 y 42)
PIR, 4to estadio-F18/sin exponer	1 (~33.8)	2 (~33.8 y 42)	ND

¹Para el tratamiento con DiPel + antibióticos se usó el contenido intestinal de 4 larvas, para el tratamiento con sólo antibióticos se usó el de 6 larvas; para el de DiPel el de 8 larvas, y para el control sin exponer, el contenido de 12 larvas. De igual forma, para la colonia PIS, en el tratamiento de DiPel + antibióticos se usó el contenido intestinal de 11 larvas, para el tratamiento con sólo antibióticos se usó el de 7 larvas; para el de DiPel el de 11 larvas, y para el control, el contenido de 12 larvas

²DiPel® a una dosis de 500 UI/g de dieta.

³Antibióticos (gentamicina 100 µL + una mezcla de estreptomycinina 100µL+ penicilina 200µL) en 6 g de dieta.

ND= no detectada

Posteriormente, se analizó la actividad enzimática por ensayos de *activity blot* usando SAAPFpNA o BApNA, pero empleando el jugo gástrico de máximo 12 larvas del cuarto estadio de las diferentes colonias (PIS y PIR) expuestas a tratamiento con antibióticos (gentamicina+ estreptomycinina+ penicilina) y/o al formulado comercial DiPel® a una dosis de 500 UI/g de dieta, ambos (antibióticos y DiPel®) o ninguno (control). Debido a la mortalidad que se tenía con larvas expuestas a antibióticos y DiPel®, el contenido intestinal evaluado se

extrajo de diferente cantidad de larvas, aunque la cantidad empleada para cargar cada carril fue la misma. Para la colonia PIS, del tratamiento con DiPel® + antibióticos se usó el contenido intestinal de 4 larvas, para el tratamiento con sólo antibióticos se usó el de 6 larvas; para el de DiPel® el de 8 larvas, y para el control, el contenido de 12 larvas. De igual forma, para la colonia PIS, en el tratamiento de DiPel® + antibióticos se usó el contenido intestinal de 11 larvas, para el tratamiento con sólo antibióticos se usó el de 7 larvas; para el de DiPel® el de 11 larvas, y para el control, el contenido de 12 larvas.

Los resultados del bioensayo *activity blot* con SAAPFpNA mostraron que la actividad enzimática en el tratamiento con sólo antibióticos de la colonia PIS fue diferente, ya que se observa una zona de hidrólisis correspondiente a una proteasa de Mf ~33.8 kDa (carril A2) mientras que el resto muestran dos proteasas de Mf ~33.8 y 42 kDa (Fig. 8A). Es importante resaltar que la muestra del contenido intestinal de larvas sin tratar (carril A4) fueron las que desarrollaron las bandas de hidrólisis más débiles, a pesar de que se usó el contenido de 12 larvas. Al evaluar la actividad enzimática a SAAPFpNA de la colonia PIR se observaron muchas diferencias, ya que el contenido intestinal de larvas tratadas con DiPel® y antibióticos no desarrolló la banda de hidrólisis ~33.8 kDa (carril A5), mientras que la muestra de larvas tratadas sólo con antibióticos no desarrolló ninguna de las dos (carril A6), mientras que las tratadas con DiPel® o sin tratar no mostraron diferencias comparado con la colonia PIS, ya que desarrollaron las mismas zonas de hidrólisis por proteasas de Mf ~33.8 y 42 kDa (carriles A7 y A8, Fig. 8A). Igual a lo observado con el análisis de larvas de la colonia PIS, la muestra del contenido intestinal de larvas sin tratar (carril A8) fueron las que desarrollaron las bandas de hidrólisis más débiles.

En el *activity blot* donde se usó BApNA, igual que en el estudio anterior todas las muestras presentaron una sola banda de ~33.8 kDa, aquí el carril con muestra cargada con homogeneizado de larvas tratadas con antibióticos mostró una menor hidrólisis (carril B2), al igual que el control sin tratar (carril B4). Al igual que lo observado contra SAAPFpNA la muestra de larvas tratadas sólo con antibióticos no se visualizó ninguna banda (carril B6), la tratada sólo con DiPel® presentó dos bandas de ~33.8 y 37 kDa y la mayor actividad de hidrólisis de todas las muestras (carril B7), mientras que el carril de contenido de larvas PIS y PIR sin tratar fueron los que desarrollaron la banda de hidrólisis más débil (carriles B4 y B8, Fig. 8) (Tabla 5).

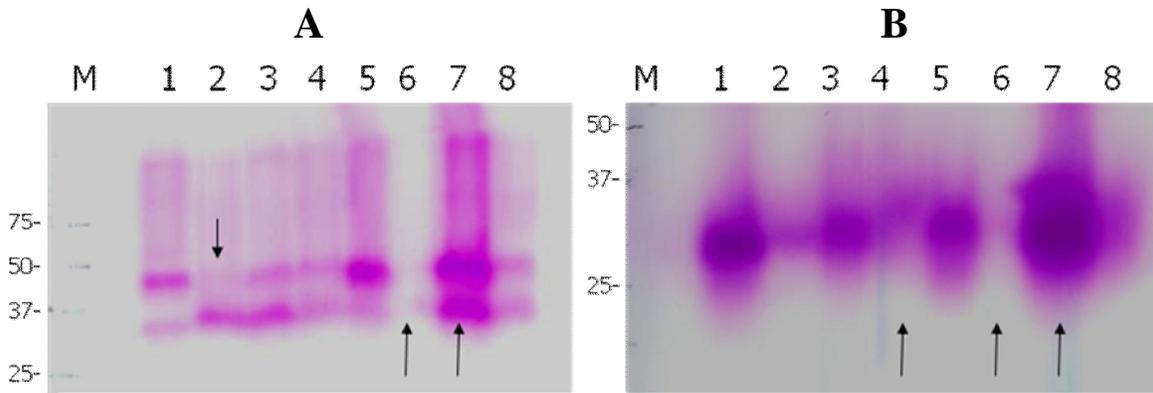


Fig. 8. Activity blots de dos colonias de *Plodia interpunctella* en base a su susceptibilidad a Bt: A) mostrando hidrólisis a SAAPFpNA; y B) mostrando hidrólisis a BApNA. Carriles M= marcador de peso molecular; del 1-4, colonia susceptible (PIS) tratada con: 1) DiPel® 500UI+ gentamicina+ estreptomicina+ penicilina; 2) gentamicina+ estreptomicina+ penicilina; 3) DiPel® 500UI; 4) Control; y del 5-8, colonia resistente (PIR) tratada con: 5) DiPel® 500UI+ gentamicina+ estreptomicina+ penicilina; 6) gentamicina+ estreptomicina+ penicilina; 7) DiPel® 500UI; 8) Control. Las larvas de ambas colonias permanecieron sin exponer a excepción del caso de bioensayos. Resultados realizados con la F18.

En el zimograma en donde la membrana se impregnó de caseína para determinar la actividad de proteasas por zonas de hidrólisis de larvas de las dos colonias de *P. interpunctella*, dos muestras que en los *activity blot* habían mostrado menor actividad (A2, A3, o B2 y B3, Fig. 8), en este bioensayo mostraron mayor actividad comparado con el resto de las muestras (carriles 2 y 3, Fig. 9) (Tabla 5).

De manera interesante, estas dos muestras provenientes de la colonia PIS que contenían el jugo gástrico de larvas tratadas con antibióticos (carril 2) o DiPel® (carril 3), mostraron cuatro zonas de hidrólisis correspondientes a proteasas de Mf ~25.7, 37, 42 y 48.5 kDa. Cabe resaltar que al igual que lo observado con la Fig. 8, en este bioensayo también el control sin tratar de ambas colonias mostró una actividad hidrolítica a la caseína muy débil (carriles 4 y 8, Fig. 9).

6.5 Aislamiento e Identificación de Bacterias por RT-PCR

Debido a que se ha asociado la activación de las protoxinas de Bt no sólo a la actividad enzimática sino también al contenido y carga de la flora microbiana intestinal, se evaluó la presencia de bacterias entre ambas colonias empleando ensayos de detección e identificación por RT-PCR y análisis bioquímicos.

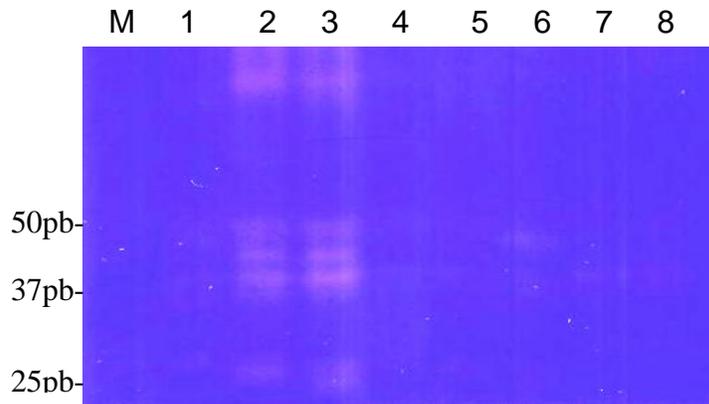


Fig. 9. Zimograma para detectar la capacidad de hidrólisis a caseína de dos colonias de *Plodia interpunctella* en base a su susceptibilidad a Bt. Carriles M= marcador de peso molecular; del 1-4, colonia susceptible (PIS) tratada con: 1) DiPel® 500UI+ gentamicina+ estreptomycin+ penicilina; 2) gentamicina+ estreptomycin+ Penicilina; 3) DiPel® 500UI; 4) Control; y del 5-8, colonia resistente (PIR) tratada con: 5) DiPel® 500UI+ gentamicina+ estreptomycin+ penicilina; 6) gentamicina+ estreptomycin+ penicilina; 7) DiPel® 500UI; 8) Control. Las larvas de ambas colonias permanecieron sin exponer a excepción del caso de bioensayos. Resultados realizados con la F18.

Los resultados iniciales mostraron la presencia de dos grupos de la familia de Enterobacterias con pesos de ~80 y 450 kDa (carril Eb, Fig. 10), donde se comparó la amplificación de transcritos contra los de flora entérica, enterobacterias, el gen constitutivo S7 y el péptido antimicrobiano hemolina.

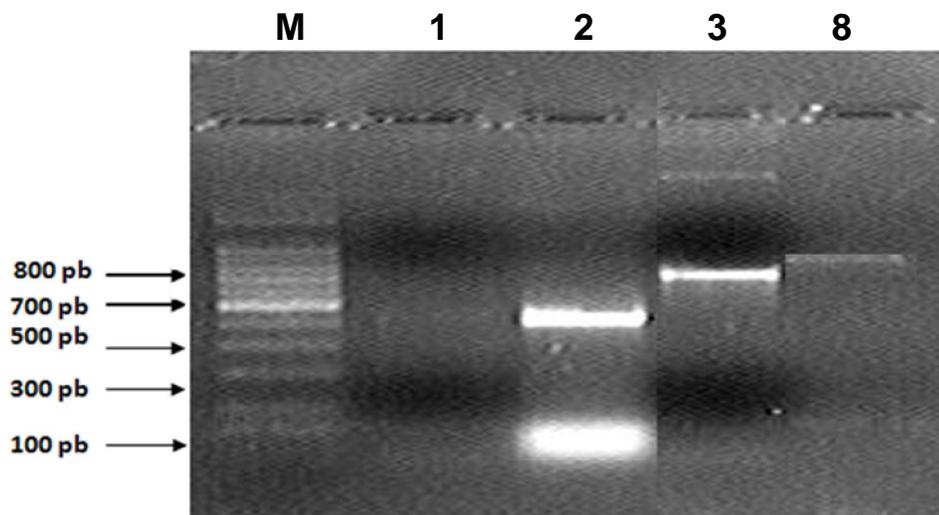


Fig. 10. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio mostrando las bandas de la amplificación de productos del análisis RT-PCR de ARN ribosomal extraído de larvas completas de *P. interpunctella* F20. Carriles M = marcador molecular, 1 = Flora Entérica; 2 = Enterobacterias (450 pb); 3 = hemolina (810 pb), 4 = proteína ribosomal S7 (880 pb).

Ya bien definidas las condiciones para la amplificación de los transcritos para enterobacterias, se comparó su expresión de genes relacionados a la familia Enterobacteriaceae entre las colonias PIS y PIR de *P. interpunctella* y la exposición al Biobit®. Los resultados del análisis molecular se muestran en la Tabla 6. La expresión del gen se observó en todos los tratamientos, tanto en larva total como en muestras de intestino, pero fue menor en larvas completas de la colonia PIR, sin exponer o expuestas al Biobit®, comparada contra muestras del intestino de la colonia PIS expuesta al Biobit®, intestino de la colonia PIR sin exponer y expuesta al Biobit®. Posterior a este análisis se comprobó que la expresión homogénea el transcrito para hemolina estaba presente en ambos tratamientos, tanto en larva total como intestino.

Tabla 6. Expresión de genes relacionados a la familia enterobacteriaceae entre las colonias PIS Y PIR de *P. Interpunctella* y la exposición al Biobit®

Tratamientos y colonias de <i>P. interpunctella</i>	Sin Exponer a Bt	Expuesta a Biobit®
PIS larva completa	+++	+++
PIS intestino medio	+	+++
PIR larva completa	+	+
PIR intestino medio	+++	+++

6.6 Porcentaje de mortalidad de *P. interpunctella* al exponerse a antibióticos y Biobit®

Al realizar bioensayos de las diferentes colonias expuestas a antibióticos para comprobar los cambios de susceptibilidad al Biobit®, se observó un mismo patrón entre ambas colonias expuestas a la combinación de antibióticos y Biobit® a las dos dosis empleadas (Fig. 11). De cualquier forma en ambas colonias se observó un promedio de 50% de mortalidad al exponerlas al antibiótico. En la colonia susceptible se observaron diferencias en el porcentaje de mortalidad al exponer al Biobit® comparada con las expuestas al antibiótico (Fig. 11A), mientras que en la resistente no se observaron diferencias (Fig. 11B).

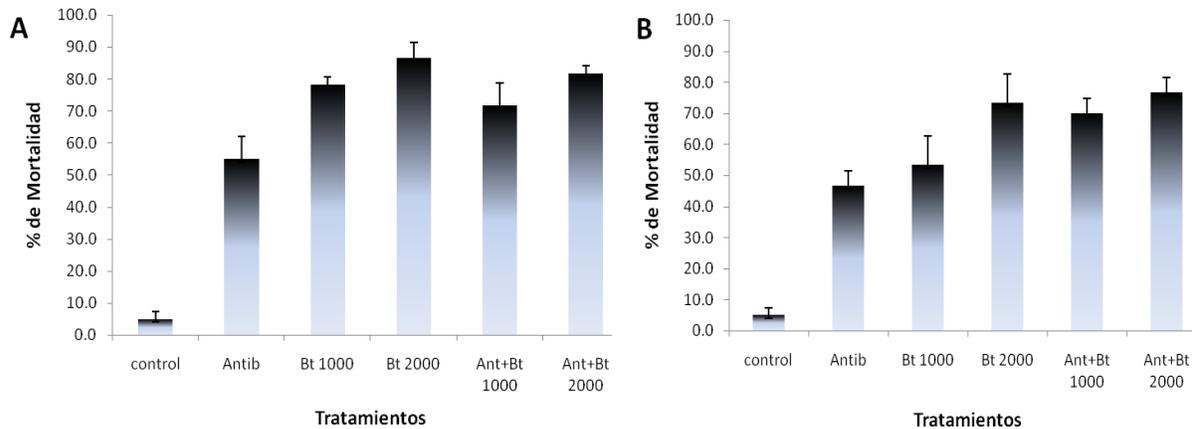


Fig. 11. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plodia interpunctella* expuestas a Biobit® y antibióticos. A) Colonia susceptible (PIS); B) Colonia resistente (PIR). Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar. Valores promedio de dos repeticiones. Las larvas de ambas colonias permanecieron sin exponer a excepción del caso de bioensayos. Resultados realizados con la F20.

6.7 Aislamiento e Identificación de Bacterias por Biolog GN2

6.7.1 Bacterias aerobias

El cultivo colonial desarrollado en condiciones de aerobiosis en medio de agar nutritivo, obtenido de la inoculación con contenido del intestino de larvas de la colonia PIS, mostró un tipo de desarrollo colonia, donde se observaron 3 colonias de 7 mm de diámetro, de color amarillo claro (beige) y gomoso, de bordes regulares. Al realizar la tinción de Gram el resultado fue un bacilo móvil Gram (-). El segundo crecimiento colonial encontrado en el medio de agar soya tripticasa, mostró múltiples colonias de color blanco de máximo 5 mm de diámetro. La tinción Gram mostró cocos Gram (+). Después del crecimiento se seleccionaron colonias aisladas para crecerlas por separado en caldo nutritivo. El cultivo de 24 h de cada colonia se usó para inocular microplacas específicas para aerobias Gram (+) y Gram (-) y se realizaron prueba bioquímicas para su identificación, usando el sistema Biolog GN2. Los resultados identificaron al primer cultivo como a la enterobacteria *Brevundimonas (Pseudomonas) vesicularis* (Fig. 12).

6.7.2. Bacterias anaerobias

En condiciones de anaerobiosis se observó el desarrollo de colonias más diversas de las encontradas en condiciones de aerobiosis, pero no se observó ningún crecimiento del contenido intestinal de la colonia PIR (Tabla 7).

Tabla 7. Crecimiento colonial bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis del contenido intestinal de dos colonias de *Plodia interpunctella*, una susceptible (PIS) y otra resistente (PIR) a toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*

Medios de cultivo para	Intestino de larvas PIS	Gram	Intestino de larvas PIR	Gram
Aerobios				
Agar nutritivo	3 Colonias beige	Bacilos (-)	4 Colonias beige	Bacilos (-)
Agar tripticasa soya	Múltiples colonias blancas	Coco (+)	negativo	negativo
Anaerobios				
Agar nutritivo	2 Colonias blancas	Coco (+)	negativo	negativo
	2 Colonias beige	Bacilos (-)	negativo	negativo
Agar tripticasa soya	1 Colonia blanca	Coco (+)	negativo	negativo
	2 Colonias beige puntiforme	Bacilos (-)	negativo	negativo

En los medios agar nutritivo y agar soya tripticasa, el contenido del intestino de larvas de la colonia PIS se observaron colonias muy similares a las encontradas en condiciones de aerobiosis, es decir, colonias de color blanco de máximo 5 mm de diámetro, mostrando cocos Gram (+) por tinción Gram, además de colonias de 7 mm de diámetro, de color amarillo claro (beige) y gomoso, de bordes regulares, mostrando bacilos móviles Gram (-) por tinción Gram.

Además de las colonias similares a las desarrolladas en medio de aerobiosis, en anaerobiosis se observó el desarrollo de dos colonias de bordes puntiformes de color amarillo claro (beige), mostrando ser bacilos Gram (-).

En todos los casos se cultivaron a partir de una colonia aislada en caldo soya tripticasa en anaerobiosis en el sistema Gas-Pak y con el crecimiento de 48 h se inoculó en el sistema Biolog para pruebas bioquímicas para su identificación, usando la placa correspondiente a

bacilos anaerobios cortos Gram (-) que se identificó como *Yersinia pestis* o *Y. kristensenii* (Tabla 6; Fig. 14). Los resultados identificaron a *Haemophilus paragallinarum* (Tabla 6; Figs. 12 y 15) proveniente de la colonia de bordes puntiformes.

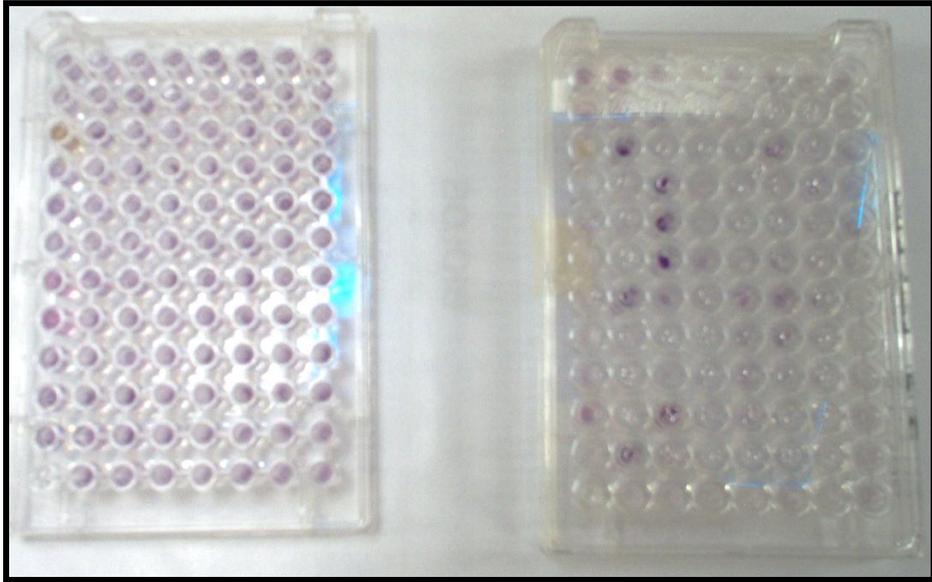


Fig. 12. Identificación bioquímica de los aislamientos obtenidos del intestino de larvas de *Plodia interpunctella* empleando el método de corrimiento de 95 pruebas simultáneas el sistema Biolog GN2 Microplate, después de 24 h de incubación. Microplaca 1: *Brevundimonas vesicularis*. Microplaca 2: *Haemophilus paragallinarum*

GN2 MicroPlate™

A1 Water +	A2 α-Cyclodextrin +	A3 Dextrin +	A4 Glycogen +	A5 Tween 40 +	A6 Tween 80 +	A7 N-Acetyl-D-Galactosamine +	A8 N-Acetyl-D-Glucosamine +	A9 Adonitol +	A10 L-Arabinose +	A11 D-Arabitol +	A12 D-Cellobiose +
B1 i-Erythritol +	B2 D-Fructose +	B3 L-Fucose +	B4 D-Galactose +	B5 Gentiobiose +	B6 α-D-Glucose +	B7 m-Inositol +	B8 α-D-Lactose +	B9 Lactulose +	B10 Maltose +	B11 D-Mannitol +	B12 D-Mannose (-)
C1 D-Melibiose +	C2 β-Methyl-D-Glucoside +	C3 D-Psicose +	C4 D-Raffinose +	C5 L-Rhamnose +	C6 D-Sorbitol +	C7 Sucrose +	C8 D-Trehalose +	C9 Turannose +	C10 Xylitol +	C11 Pyruvic Acid Methyl Ester +	C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester +
D1 Acetic Acid +	D2 Cis-Aconitic Acid +	D3 Citric Acid +	D4 Formic Acid +	D5 D-Galactonic Acid Lactone +	D6 D-Galacturonic Acid +	D7 D-Gluconic Acid +	D8 D-Glucosaminic Acid +	D9 D-Gluconic Acid +	D10 α-Hydroxybutyric Acid +	D11 β-Hydroxybutyric Acid +	D12 γ-Hydroxybutyric Acid +
E1 p-Hydroxy Phenylacetic Acid +	E2 Itaconic Acid +	E3 α-Keto Butyric Acid +	E4 α-Keto Glutaric Acid +	E5 α-Keto Valeric Acid +	E6 D,L-Lactic Acid +	E7 Malonic Acid +	E8 Propionic Acid +	E9 Quinic Acid +	E10 D-Saccharic Acid +	E11 Sebacic Acid (-)	E12 Succinic Acid +
F1 Bromosuccinic Acid +	F2 Succinamic Acid +	F3 Glucuronamide +	F4 L-Alaninamide +	F5 D-Alanine +	F6 L-Alanine +	F7 L-Alanyl-glycine +	F8 L-Asparagine +	F9 L-Aspartic Acid +	F10 L-Glutamic Acid +	F11 Glycyl-L-Aspartic Acid +	F12 Glycyl-L-Glutamic Acid +
G1 L-Histidine +	G2 Hydroxy-L-Proline +	G3 L-Leucine +	G4 L-Ornithine +	G5 L-Phenylalanine +	G6 L-Proline +	G7 L-Pyroglutamic Acid +	G8 D-Serine +	G9 L-Serine +	G10 L-Threonine +	G11 D,L-Camitine +	G12 γ-Amino Butyric Acid +
H1 Urocanic Acid +	H2 Inosine +	H3 Uridine +	H4 Thymidine +	H5 Phenethylamine (-)	H6 Putrescine +	H7 2-Aminoethanol +	H8 2,3-Butanediol +	H9 Glycerol +	H10 D,L-α-Glycerol Phosphate +	H11 α-D-Glucose-1-Phosphate +	H12 D-Glucose-6-Phosphate +

Fig. 13. Resultados de las pruebas bioquímica del aislamiento correspondiente a colonias beige de 7 mm, bacilos Gram (-) obtenidos del intestino de larvas PIS de *Plodia interpunctella* empleando el método de corrimiento de 95 pruebas simultáneas el sistema Biolog GN2 Microplate, después de 24 h de incubación, indicando a la enterobacteria no entérica *Brevundimonas (Pseudomonas) vesicularis*. Similitud = 0.524; distribución = 7.55; tipo = GN-no entérico oxidasa (-); porcentaje de probabilidad = 99%. A las 4 h de incubación no se observó crecimiento.

GN2 MicroPlate™

A1 Water	A2 α-Cyclodextrin	A3 Dextrin	A4 Glycogen	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetyl-D-Galactosamine	A8 N-Acetyl-D-Glucosamine	A9 Adonitol	A10 L-Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 D-Cellulose
B1 l-Erythritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose	B4 D-Galactose	B5 Gentiobiose	B6 α-D-Glucose	B7 m-Inositol	B8 α-D-Lactose	B9 Lactulose	B10 Maltose	B11 D-Mannitol	B12 D-Mannose
C1 D-Melibiose	C2 β-Methyl-D-Glucoside	C3 D- Psicose	C4 D-Raffinose	C5 L-Rhamnose	C6 D-Sorbitol	C7 Sucrose	C8 D-Trehalose	C9 Turannose	C10 Xylitol	C11 Pyruvic Acid Methyl Ester	C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester
D1 Acetic Acid	D2 Cis-Aconitic Acid	D3 Citric Acid	D4 Formic Acid	D5 D-Galactonic Acid Lactone	D6 D-Galacturonic Acid	D7 D-Gluconic Acid	D8 D-Glucosaminic Acid	D9 D-Glucuronic Acid	D10 α-Hydroxybutyric Acid	D11 β-Hydroxybutyric Acid	D12 γ-Hydroxybutyric Acid
E1 p-Hydroxy Phenylacetic Acid	E2 Itaconic Acid	E3 α-Keto Butyric Acid	E4 α-Keto Glutaric Acid	E5 α-Keto Valeric Acid	E6 D,L-Lactic Acid	E7 Malonic Acid	E8 Propionic Acid	E9 Quinic Acid	E10 D-Saccharic Acid	E11 Sebacic Acid	E12 Succinic Acid
F1 Bromosuccinic Acid	F2 Succinamic Acid	F3 Glucuronamide	F4 L-Alaninamide	F5 D-Alanine	F6 L-Alanine	F7 L-Alanyl-glycine	F8 L-Asparagine	F9 L-Aspartic Acid	F10 L-Glutamic Acid	F11 Glycyl-L-Aspartic Acid	F12 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Histidine	G2 Hydroxy-L-Proline	G3 L-Leucine	G4 L-Ornithine	G5 L-Phenylalanine	G6 L-Proline	G7 L-Pyroglutamic Acid	G8 D-Serine	G9 L-Serine	G10 L-Threonine	G11 D,L-Camitine	G12 γ-Amino Butyric Acid
H1 Urocanic Acid	H2 Inosine	H3 Uridine	H4 Thymidine	H5 Phenethylamine	H6 Putrescine	H7 2-Aminoethanol	H8 2,3-Butanediol	H9 Glycerol	H10 D,L-α-Glycerol Phosphate	H11 α-D-Glucose-1-Phosphate	H12 D-Glucose-6-Phosphate

Fig. 13. Resultados de las pruebas bioquímica del aislamiento correspondiente a colonias de 3mm color blanco, mostrando ser bacilos cortos Gram (-), obtenido del intestino de larvas PIS y PIR de *Plodia interpunctella* empleando el método de corrimiento de 95 pruebas simultáneas el sistema Biolog GN2 Microplate, después de 24 h de incubación, indicando a la enterobacteria *Yersinia pestis*. Similitud = 0.551; distribución = 7.07; tipo = GN entérica; porcentaje de probabilidad = 99%. A las 4 h de incubación no se observó crecimiento.

BIOLOG												Gram Negative Identification Test Panel																																																																																			
GN2 MicroPlate™																																																																																															
A1 Water	A2 α-Cyclodextrin	A3 Dextrin	A4 Glycogen	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetyl-D-Galactosamine	A8 N-Acetyl-D-Glucosamine	A9 Adonitol	A10 L-Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 D-Cellobiose	B1 l-Erythritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose	B4 D-Galactose	B5 Gentiobiose	B6 α-D-Glucose	B7 m-Inositol	B8 α-D-Lactose	B9 Lactulose	B10 Maltose	B11 D-Mannitol	B12 D-Mannose	C1 D-Melibiose	C2 β-Methyl-D-Glucoside	C3 D- Psicose	C4 D-Raffinose	C5 L-Rhamnose	C6 D-Sorbitol	C7 Sucrose	C8 D-Trehalose	C9 Turannose	C10 Xylitol	C11 Pyruvic Acid Mono-Methyl-Ester	C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester	D1 Acetic Acid	D2 Cis-Aconitic Acid	D3 Citric Acid	D4 Formic Acid	D5 D-Galactonic Acid Lactone	D6 D-Galacturonic Acid	D7 D-Gluconic Acid	D8 D-Glucosaminic Acid	D9 D-Glucuronic Acid	D10 α-Hydroxybutyric Acid	D11 β-Hydroxybutyric Acid	D12 γ-Hydroxybutyric Acid	E1 p-Hydroxy Phenylacetic Acid	E2 Itaconic Acid	E3 α-Keto Butyric Acid	E4 α-Keto Glutaric Acid	E5 α-Keto Valeric Acid	E6 D,L-Lactic Acid	E7 Malonic Acid	E8 Propionic Acid	E9 Quinic Acid	E10 D-Saccharic Acid	E11 Sebacic Acid	E12 Succinic Acid	F1 Bromosuccinic Acid	F2 Succinamic Acid	F3 Glucuronamide	F4 L-Alaninamide	F5 D-Alanine	F6 L-Alanine	F7 L-Alanyl-glycine	F8 L-Asparagine	F9 L-Aspartic Acid	F10 L-Glutamic Acid	F11 Glycyl-L-Aspartic Acid	F12 Glycyl-L-Glutamic Acid	G1 L-Histidine	G2 Hydroxy-L-Proline	G3 L-Leucine	G4 L-Omithine	G5 L-Phenylalanine	G6 L-Proline	G7 L-Pyroglyutamic Acid	G8 D-Serine	G9 L-Serine	G10 L-Threonine	G11 D,L-Carnitine	G12 γ-Amino Butyric Acid	H1 Urocanic Acid	H2 Inosine	H3 Uridine	H4 Thymidine	H5 Phenethyl-amine	H6 Putrescine	H7 2-Aminoethanol	H8 2,3-Butanediol	H9 Glycerol	H10 D,L-α-Glycerol Phosphate	H11 α-D-Glucose-1-Phosphate	H12 D-Glucose-6-Phosphate

Fig. 13. Resultados de las pruebas bioquímica del aislamiento correspondiente a colonias beige de de bordes puntiformes, bacilos cortos Gram (-) obtenidos del intestino de larvas PIS de *Plodia interpunctella* empleando el método de corrimiento de 95 pruebas simultáneas el sistema Biolog GN2 Microplate, después de 48 h de incubación, indicando a la bacteria *Haemophilus paragallinarum*. Similitud = 0.500; distribución = 7.93; tipo = GN (-), fosfatasa (-) y oxidasa (-); porcentaje de probabilidad = 99%. A las 4 y 24 h de incubación no se observó crecimiento.

7. DISCUSIÓN

El desarrollo de resistencia de insectos, tanto a químicos como a biológicos, es resultado de dos factores: tiempo y frecuencia de la exposición a las toxinas. Hablando en el caso específico de Bt, los insectos llevan a cabo una serie de ajustes fisiológicos y genéticos para evitar la activación de la toxina, el anclaje de la misma o para reparar el daño que causa a nivel de intestino medio (Griffitts y Aroian, 2005). Uno de los primeros mecanismos que se describió fue el cambio en la actividad enzimática relacionado a la activación de la protoxina a toxina (Oppert *et al.*, 1997), como el nivel de producción de proteasas (Oppert, 1999), aunado a modificaciones en los sitios de unión de las toxinas a los receptores del intestino (Herrero *et al.*, 2001).

P. interpunctella fue el primer lepidóptero en donde se reportó resistencia a toxinas Cry de Bt (McGaughey, 1985). En estudios posteriores, el mismo grupo de investigación demostró diferencias en el desarrollo de resistencia entre diferentes colonias de *P. interpunctella* (McGaughey y Beeman, 1988) y a diferentes toxinas y productos a base de Bt (McGaughey y Johnson, 1994). A este respecto, la diferencia de las colonias PIS y PIR evaluadas en este estudio habían mostrado diferencias de resistencia a las toxinas era mayor, especialmente era más marcada para Cry1Ac (237 veces) comparada con Cry1F (>80 veces) o Cry1Aa (66 veces), mientras que para DiPel® fue sólo 10 veces mayor (Tabla 1), esto para la F1, pero cuando nosotros las evaluamos nuevamente sin haberse expuesto hasta la F6 encontramos que la diferencias de mortalidad ocasionada por el Biobit® fue sólo de 3 veces (no se muestran los datos). Al dejar de exponer la colonia resistente (PIR) a toxinas o productos de Bt, la resistencia al exponerse al Biobit® se fue acortando al menos de 2 veces en la (Fig. 3), pero se siguieron observando diferencias en base a error estándar. A pesar de que las protoxinas presentes en el DiPel® son iguales que las del Biobit®, es difícil definir la cantidad de cada toxina en cada producto (Valent Biosciences Corporation, www.valentbiosciences.com). En este estudio se observó un desarrollo de resistencia muy marcado de la colonia PIR en particular a la toxina Cry1Ac, similar a lo observado anteriormente con este mismo insecto (Oppert *et al.*, 1996), además de con el gusano elotero *H. virescens* a nivel de laboratorio

(Forcada *et al.*, 1999) y el gusano falso medidor *T. ni* en poblaciones presentes en cultivo de tomate de invernadero (Wang *et al.*, 2007).

Otro factor que influye en la susceptibilidad a Bt es el estadio larvario del insecto. Informes anteriores han indicado que las primeras etapas de lepidópteros son más susceptibles a las toxinas Bt y los virus (Huang *et al.*, 1999; Li y Bower, 2012; Valadéz-Lira *et al.*, 2012). En el presente estudio, después de no exponer las colonias a Bt se evaluó la relación entre la susceptibilidad a mismo entre las colonias PIS y PIR en larvas del 1er y 3er estadio. Los resultados mostraron que aunque se vio una reducción en la susceptibilidad al Biobit®, las diferencias no fueron significativas en base a los límites de confianza al 95% (Tabla 4). De cualquier forma, mientras que para larvas del 1er estadio de las colonias PIS y PIR se requerían 75 y 177 UI/g, respectivamente para matar al 50% de la población, para larvas del 3er estadio se requerían 248 y 502 UI/g, respectivamente, para alcanzar la misma mortalidad. Similar relación entre la susceptibilidad a Bt y la edad de las larvas se había estudiado en *P. interpunctella* por Nwanze *et al.* (1975), quienes encontraron que mediante el uso de una dosis de 25 mg/kg de dieta de trigo integral utilizando DiPel® en un bioensayo similar al empleado en este estudio, las larvas del 1er estadio (0-48 h de edad) de *P. interpunctella* presentaban un 100% de mortalidad; mientras que larvas del 5to estadio (18 a 21 días de edad), requerían 200 mg/kg para obtener ese nivel de mortalidad.

En un estudio diferente donde se evaluaron larvas de segundo y cuarto estadio de cuatro lepidópteros diferentes, *P. interpunctella* fue el menos y *H. virescens* el más susceptible a Biobit®. El porcentaje de mortalidad contra larvas del 2do estadio expuestas al valor calculado de CL₅₀ de Biobit® fue similar a la predicha del 50% en tres de los insectos evaluados. De acuerdo con bioensayos anteriores, *P. interpunctella* es susceptible a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac presentes en el Biobit®, además de la Cry1C y Cry1F, pero este producto no fue eficaz contra insectos del 4to estadio larvario (Valadez-Lira *et al.*, 2012). En este estudio se relacionó la diferencia con la respuesta inmune. Del mismo modo, Kwon y Kim (2008) reportaron que las larvas del 5to estadio de *S. exigua* expuestas a dos productos a base de Bt no mostraron diferencias en la mortalidad en comparación con la de los controles no expuestos, pero si se aplicaba además el inmunosupresor bencil-idene-acetona, se incrementaba la mortalidad hasta en un 80%. Como se describió en antecedentes, se ha reportado actividad antibacteriana como resultado de la producción de péptidos antimicrobiales (PAM) producidos

por el insecto en la hemolinfa. En la Universidad de Estocolmo, Suiza se investigaron las proteínas antibacterianas de bajo peso molecular del lepidóptero de *Hyalophora cecropia* L., conocidas como cecropinas, donde además de las cecropinas A y B ya conocidas, descubrieron cinco proteínas antibacterianas nuevas, las cecropinas C, D, E y F, y el factor G. Al evaluar su rango de acción se encontró que la actividad antibacteriana de las cecropinas A, B y D eran altamente activas contra varias bacterias Gram (+) y Gram (-) (Hultmark *et al.*, 1982). Para determinar si la hemolinfa o el contenido intestinal de las diferentes colonias de *P. interpunctella* evaluadas en este estudio presentaban actividad antibacteriana, se realizaron bioensayos contra las bacterias *S. marcescens* y *E. coli*. Los resultados mostraron que únicamente el contenido intestinal de la colonia PIR tenía actividad antibacteriana (Fig. 4) lo cual nos hizo suponer que podría estar produciendo algún PAM. Al emplear diferentes cebadores de PAM en nuestras colonias de *P. interpunctella*, fue posible amplificar el transcrito del PAM hemolinfa sólo entre muestras de la colonia PIR, expuesta o sin exponer al Biobit®, tanto de larvas completas como de intestinos, confirmando la presencia de este péptido resultado de la respuesta inmune innata y relacionado a una menor susceptibilidad a Bt (Fig. 6). De manera similar, Engelhard y Volkman (1995), exponiendo *T. ni* por vía oral al nucleo-poliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV), se encontró que las larvas del 4to. estadio eran más resistentes en comparación con los estadios larvarios anteriores, probablemente debido a su capacidad para eliminar completamente la infección por AcMNPV del epitelio del intestino medio. McNeil *et al.* (2010) observaron resultados similares al evaluar la respuesta inmune celular y humoral de *Lymantria dispar* L. después de evaluar el nucleopoliedrovirus (LdMNPV) contra larvas neonatas y del 4to estadio. La hemolinfa es una proteína de respuesta inmune, se expresa en la hemolinfa de *P. interpunctella* y se ha relacionado con la respuesta inmune después de retos bacterianos y durante las mudas larvarias, en donde se demostró que la producción de hemolinfa era mayor entre larvas del 5to estadio comparadas con larvas del 4to (Aye *et al.*, 2004). Inicialmente se pensó que la expresión de este PAM aumentaba en infecciones causadas por baculovirus y bacterias en Noctuidos, pero estudios recientes han demostrado que se estimula por bacterias (Terenius *et al.*, 2009) y en preparación para la pupa, pues su producción se incrementa en la cutícula de larvas del 5to. estadio (Aye *et al.*, 2008).

En *P. interpunctella* se ha reportado que la actividad específica de las proteasas del intestino (Zhu *et al.*, 2000a, o modificaciones en el anclaje de la toxina o la afinidad de la misma a los sitios de unión (Zhu *et al.*, 2000b), puede llevar a la pérdida de susceptibilidad a toxinas o productos de Bt. Entre las colonias de *P. interpunctella* evaluadas en este trabajo se encontraron las mayores diferencias de susceptibilidad a la toxina Cry1Ac. En el caso de *T. ni*, al evaluar los sitios de unión a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac se observó que compartían los mismos sitios de unión (Estada y Ferré, 1994). En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio con diferentes colonias de *H. virescens*, los resultados mostraron mayor susceptibilidad a la toxina Cry1Ab, comparada con la Cry1Ac (que se expresa en algodón Bt) y la Cry1Aa (Martinez-Valenzuela *et al.*, 2012), aunque no se evaluó la Cry2Ab. En otro trabajo, al comparar la susceptibilidad de dos colonias resistentes de *P. interpunctella* a las toxinas y protoxinas Cry1Ab y Cry1Ac de Bt, una de las colonias resistentes presentaba dos sitios de unión a la toxina Cry1Ab y uno de estos lo compartía con la toxina Cry1Ac, pero era 11 veces más resistente a la protoxina Cry1Ab que a la toxina, es decir que la resistencia a las protoxinas (la forma en que está presente en el producto comercial) pero no habían diferencias entre la protoxina y toxina Cry1Ac, indicando que la activación de la toxina Cry1Ab por las proteasas intestinales confería la resistencia a Cry1Ab, independientemente de cambios en sitios de unión (Herrero *et al.*, 2001). Como nosotros habíamos observado diferencias de susceptibilidad a Bt entre diferentes estadios larvarios y las dos colonias de *P. interpunctella*, comparamos la actividad hidrolítica a BApNA, SAAPFpNA y caseína entre larvas del 2do y 5to estadio. Mientras que las zonas de hidrólisis desarrolladas usando BApNA no mostraron diferencias entre los diferentes tratamientos, con SAAPFpNA las muestras de la colonia PIS del 2do y 5to estadio sin exponer a Bt mostraron sólo dos bandas de ~26.6 y 42.2 kDa, mientras que las de la colonia PIR, las 2do estadio presentaron tres bandas de ~25.7, 38 y 42.8 kDa y las del 5to estadio bandas similares a las de la colonia PIS, además de dos bandas de ~60 y 75 kDa (Fig. 7, Tabla 5). Al evaluar la actividad caseinasa únicamente se observaron dos bandas, una de ~33.8 kDa similar a lo observado con BApNA (tipo tripsina), y la de ~25.7 kDa similar a la de SAAPFpNA (tipo quimiotripsina), indicando con esto que ciertas las proteasas poseían actividad contra tripsina y quimiotripsina (especialmente al alcanzar el 5to. estadio) y de caseína y tripsina o caseína y quimiotripsina, independientemente del estadio larvario. Estos

resultados son similares a los reportados previamente para este mismo insecto por Oppert *et al.* (1994).

En un estudio independiente realizado con la plaga de campo palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L., se había observado que cuando las larvas eran parasitadas por la avispa parasitoide *Cotesia plutellae* Kurdjumov, se inducía una inmunosupresión muy fuerte (Bae y Kim, 2004). Al evaluar el factor que inducía esta inmunosupresión encontraron la presencia de un bracovirus simbiote (*CpBV*) el cual expresaba el gen *kV* (*CpBV-IkB*), muy similar a otro inmunosupresor previamente descrito para *Drosophila melanogaster* L. (Ibrahim *et al.*, 2005). El gen *CpBV-IkB* se clonó y aplicó por micro-proyectiles a larvas no parasitadas de *P. xylostella* y se observó una inhibición de la expresión de la hemolina. Posteriormente se insertó el *CpBV-IkB* en el baculovirus de *Autographa californica* *AcMNPV* (*AcMNPV-CpBV-IkB*) y se administró oralmente a larvas de *P. xylostella*, las cuales posteriormente se expusieron a un producto a base de Bt, causando que las larvas se volvieran significativamente más susceptibles a Bt comparadas con las larvas expuestas a Bt pero no al *AcMNPV-CpBV-IkB* (Shrestha *et al.*, 2009). De esa forma se pudo confirmar que la inhibición de la producción de hemolina incrementaba la susceptibilidad a Bt por parte de otro lepidóptero. Tal y como se mencionó antes, se ha reportado una mayor producción de hemolina en larvas de *P. interpunctella* después de exponerlas a bacterias y durante el 5to estadio larvario (Aye *et al.*, 2004; -2008). Por todo esto, en un segundo experimento nosotros evaluamos la actividad enzimática en larvas del 2do y 5to estadio, expuestas o no a Bt, solo o en combinación con antibióticos o sólo antibióticos. Los resultados mostraron que la actividad enzimática del contenido intestinal para hidrolizar SAAPFpNA en el tratamiento con sólo antibióticos de la colonia PIS fue diferente, ya que sólo desarrolló una banda mientras que el resto mostraron dos (Fig. 8A, Tabla 5). Así también, el contenido intestinal de larvas sin tratar fueron las que desarrollaron las bandas de hidrólisis más débiles, a pesar de que provenía de una muestra con 12 larvas. Al evaluar esta actividad por la colonia PIR se observó que las larvas tratadas con Bt y antibióticos no desarrolló una banda, las larvas tratadas sólo con antibióticos no desarrolló ninguna y las tratadas con sólo Bt o sin tratar no mostraron diferencias comparado con la colonia PIS, ya que desarrollaron las mismas bandas y las larvas sin tratar también con esta colonia desarrollaron las bandas de hidrólisis más débiles. Para el caso de actividad enzimática contra BApNA, al igual que en la primera evaluación todas las muestras presentaron una sola

banda, la cual fue más débil en larvas tratadas con Bt y antibióticos y el control sin tratar (Fig. 8B). La muestra de larvas tratadas sólo con antibióticos no desarrolló ninguna banda y la tratada sólo con Bt presentó dos bandas y la mayor actividad de hidrólisis de todas las muestras, mientras que larvas de ambas colonias (PIS y PIR) desarrollaron la banda de hidrólisis más débil. De forma opuesta, las muestras de larvas que desarrollaron las bandas de hidrólisis más débiles contra BApNA y SAAPFpNA, mostraron mayor hidrólisis de caseína (Fig. 9), que correspondían a larvas de la colonia PIS tratadas con antibióticos o Bt, además de desarrollar 4 bandas de hidrólisis. En su conjunto, estos resultados muestran que la exposición a Bt estimula la producción de proteasas relacionadas a la hidrólisis de tripsina y quimiotripsina, pero se inhibe con la aplicación de antibióticos, caso contrario a lo que sucede con la hidrólisis de la caseína (Tabla 5).

De forma similar a nuestros resultados, en un estudio de proteómica (detección y evaluación de enzimas por biología molecular) realizado con una colonia susceptible y otra resistente a Bt (mayormente a la toxina Cry1Ab) de *P. interpunctella*, Candas *et al.* (2003) observaron una importante reducción de actividad hidrolítica tipo quimiotripsina en el intestino medio de las larvas resistentes a Bt, y la subsecuente disminución en la activación de la toxina, confirmando que el cambio fisiológico de actividad de procesar la quimitripsina está correlacionado con la disminución en la susceptibilidad a toxinas de Bt. De cualquier forma observamos que en los insectos expuestos a Bt se incrementa la actividad de proteasas, ya que comparado con los insectos tratados, los controles siempre mostraron una actividad enzimática menor (Fig. 9, Tabla 5).

Aunado a la relación entre activación enzimática de protoxinas de Bt y su susceptibilidad o resistencia al mismo, en el intestino de la palomilla gitana *Lymantria dispar* L. se reportó su asociación con bacterias al amplificar genes de *-Proteobacterias* y bacterias pertenecientes al grupo de Gram (+) con bajo contenido de G-C, por PCR 16S ribosomal (Broderick *et al.*, 2004). Más tarde, el mismo grupo reportó que *Enterococcus* sp. (Gram +) y *Enterobacter* sp. Gram (-), eran las bacterias predominantes en este insecto y lo más importante, que se requerían para la activación de Bt, por lo cual al ser eliminadas con antibióticos el insecto no era igual de susceptible al bioinsecticida (Broderick *et al.*, 2006). En concordancia con lo reportado con *L. dispar*, en una evaluación preliminar nosotros detectamos

por amplificación de genes de *Enterobacter* sp., (Fig. 10) y la presencia de bacterias con morfología y tinción relacionada a *Enterococcus* sp., en intestino de *P. interpunctella*.

En un estudio posterior, Broderick *et al.* (2009, -2010) ampliaron la búsqueda de insectos que presentaran una relación entre la presencia de bacterias en el intestino medio y la susceptibilidad al Bt, evaluando seis especies diferentes de lepidópteros. Ellos trataron a cinco especies con el formulado comercial DiPel®, que contiene esporas y cristales de Bt, específicamente a las mariposas blanquita de la col *Pieris rapae* (L.) y dama pintada *Vanessa cardui* (L.); así como a las plagas conocidas como gusano del tabaco *Manduca sexta* (L.), gusano rosado *Pectinophora gossypiella* (Saunders) y gusano cogollero *H. virescens*. Además, ellos re-evaluaron a la palomilla gitana *L. dispar* con DiPel® o únicamente con la toxina MVP. En un análisis de los microorganismos presentes en el intestino de estos insectos, ellos no detectaron bacterias en *H. virescens*, mientras que en *P. gossypiella* sólo detectaron Gram (+), mientras que en el resto encontraron Gram (-). En todos los otros insectos evaluados no se detectaron bacterias después de la aplicación del antibiótico. Asimismo, se redujo el porcentaje de mortalidad causado por el DiPel® o la toxina de Bt entre las especies que respondieron a la aplicación del antibiótico y la presencia de bacterias Gram (-), quienes también recuperaron la susceptibilidad al Bt al suministrar oralmente la especie de *Enterobacter* NAB3. Para su sorpresa, ellos observaron que incluso en *P. gossypiella* se incrementaba la mortalidad de larvas si se suministraba oralmente *Enterobacter* NAB3 y se alimentaba en una dieta con la toxina MVP. Se observó una sobreexpresión de genes relacionados a bacterias de la familia Enterobacteriaceae presentes en la flora del intestino medio de colonias resistentes y susceptibles expuestas a Bt, y la cepa resistente sin exponer (Broderick *et al.*, 2009, -2010).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en este trabajo hemos encontrado concordancia, ya que nosotros observamos que en el intestino de larvas resistentes (colonia PIR, sin exponer o expuestas al Biobit®) por amplificación de genes de la familia Enterobacteriaceae, su expresión fue muy baja comparada contra muestras del intestino de larvas susceptibles (colonia PIS sin exponer o expuesta al Biobit®) (Tabla 6). De cualquier forma, en ambas colonias se logró amplificar el gen de Enterobacterias; esto significa que están presentes en la flora entérica de las larvas.

Cuando nosotros combinamos la administración de antibióticos para reducir la carga bacteriana con el Biobit®, el patrón de porcentaje de mortalidad entre ambas colonias no fue

diferente (Fig. 11), pero la mortalidad causada únicamente por el antibiótico fue mayor a la esperada (alrededor del 50%). Como se mencionó antes, Broderick *et al.* (2009) encontraron que de seis lepidópteros evaluados de forma similar, únicamente con *P. gossypiella* se incrementó la susceptibilidad a Bt al combinarlo con bacterias. Posterior a este trabajo, Johnston y Crickmore (2009) realizaron una evaluación similar contra *M. sexta* diferenciando la mortalidad de larvas criadas bajo tres tratamientos: 1) en condiciones asépticas (exponiendo los adultos a antibióticos, esterilizando superficialmente los huevecillos con formalina y exponiendo una sola vez a larvas del 1er estadio a antibióticos), 2) exponiendo al insecto a antibióticos todo el ciclo; y 3) sin exponer a antibióticos. Larvas del 3er estadio de los tres tratamientos recibieron DiPel®. Ellos encontraron que la mortalidad era significativamente más rápida en el primer tratamiento (condiciones asépticas), seguido por el tercero (sin antibióticos) y las que tardaron más en morir fueron las expuestas a antibióticos todo el tiempo. Ellos así concluyeron que no se requiere de bacterias intestinales para que el insecto sea susceptible a DiPel®, pero que si se puede afectar su metabolismo. Esto pudiera estar relacionado a la mortalidad que nosotros observamos en este estudio al aplicar antibiótico a la dieta, ya que los insectos estuvieron expuestos durante toda la fase de larva (Fig. 11). Quizá nuestro resultado esté asociado más a la toxicidad causada por el antibiótico que por el cambio en la flora bacteriana intestinal.

Posteriormente se procedió a cultivar las bacterias presentes en el intestino de ambas colonias, donde se encontró una mayor diversidad y cantidad en larvas de la colonia PIS (Tabla 6). A este respecto, Aye *et al.* (2004) manifestaron que la expresión de hemolina es mayor cuando es inducida por alguna infección bacteriana, lo comprobó al inducirla con una inyección de bacterias; al igual que nuestros resultados la hemolina se ve mayormente expresada en *P. interpunctella* cuando es inducida en este caso por la presencia de Bt en las larvas resistentes y larvas resistentes expuestas a Bt.

Al contrario de lo reportado por estos investigadores, Hernández-Martínez *et al.* (2010) observaron que las larvas que presentaban mayor resistencia a Bt y una mayor respuesta inmune innata en larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner), la respuesta inmune se veía estimulada por una mayor carga bacteriana en el intestino. Por su parte, Johnston y Crickmore (2009) midieron la respuesta inmune innata mediada por actividad de fenoloxidasa en larvas de *G. mellonella*, *S. litura* y *M. sexta* y encontraron que al inmunizar previamente a las larvas de

estos insectos con la bacteria enteropatógena *E. coli* y observaron que la mortalidad se reducía significativamente en los tres insectos, especialmente con *G. mellonella*. Ellos encontraron una relación en la actividad de fenoloxidasas y la reducción de la mortalidad de larvas inmunizadas.

Con las colonias aisladas se procedió a la identificación de las bacterias presentes por medio de análisis bioquímicos, empleando el sistema Biolog GN2. En base a los resultados se logró identificar γ -proteobacteria *Brevundimonas (Pseudomonas) vesicularis*, perteneciente a las enterobacterias (Figs. 12 y 13), tanto en la colonia PIS como en la PIR, mientras que en la colonia PIS se identificaron además *Yersinia pestis* (Fig. 14) y *Haemophilus paragallinarum* (Figs. 12 y 15), además de una especie que no se pudo identificar que por su morfología se ubicó dentro de la familia *Enterococcaceae*. Es bien conocido que *Y. pestis* puede infectar insectos y humanos, ya que las pulgas son los vectores de este microorganismo, causante de la peste bubónica en humanos, enfermedad causada principalmente por la producción de toxinas. Con respecto a intoxicación de insectos por las toxinas producidas por otras especies de este género, se ha demostrado que los lisados de *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* son tóxicos contra lepidópteros y pulgas si son ingeridos, no así para el caso de lisados de *Y. pestis*, y se ha especulado que esto se podría deber a su ajuste evolutivo para que el insecto pueda actuar como vector (Chain *et al.*, 2004). La presencia de *Y. pestis* en *P. interpunctella* encontrada en este trabajo se puede deber a que juega un papel en la diseminación del microorganismo, ya que se considera que su hábitat es el suelo. De cualquier forma, algunos lepidópteros si pueden infectarse y morir por infecciones de *Y. pestis*, tal y como lo demostraron Erickson *et al.* (2011) al exponer larvas de *Galleria mellonella*. Ellos encontraron que *Y. pestis* podía sobrevivir entre los hemocitos de este insecto y, en caso de sobrevivencia, las larvas mostraban una fuerte respuesta humoral mediada por péptidos antibacterianos y producción de peróxido de hidrógeno por al menos tres días después de la exposición. En un estudio reciente para determinar si se puede controlar la virulencia de *Y. pestis* en insectos por otros microorganismos presentes en la flora microbiana en la pulga oriental de la rata *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae) mostraron que la presencia de especies reactivas al oxígeno presentes en el intestino reducían la proliferación de *Y. pestis* en la pulga, y de cómo las cepas más virulentas eran menos susceptibles a los metabolitos de las especies reactivas al oxígeno (Zhou *et al.*, 2012).

En el 2008, Aye *et al.* encontraron que la expresión de la hemolina en *P. interpunctella* es mayor en el 5to estadio larvario y que se expresa en cuerpo graso y epidermis, pero no en el intestino medio de larvas. A este respecto, en los diversos bioensayos realizados en este estudio encontramos la expresión de hemolina en intestino medio de larvas de la colonia PIR, expuestas o no al Biobit® (Fig. 6). Al realizar el bioensayo de actividad bactericida utilizando un método biológico, observamos actividad antibacteriana contra *E. coli* también en el intestino de larvas de la colonia PIR (Fig. 4). Ambos resultados podrían explicar el por qué de una menor cantidad y biodiversidad bacteriana en larvas de esta colonia comparada con la susceptible (colonia PIS). Estos resultados indican una posible relación entre actividad antibacteriana en el intestino medio y la producción de hemolina con la exposición y/o desarrollo de resistencia a Bt.

En conjunto, los trabajos de Aye *et al.* (2008), Erickson *et al.* (2011) y Zhou *et al.* (2012) nos permiten suponer que la actividad antibacteriana observada entre las larvas de *P. interpunctella* posiblemente se deban a la presencia de *Y. pestis* y que el cambio en la flora microbiana por el ajuste fisiológico derivado a la resistencia a Bt puede inducir a la supresión de este patógeno, la carga bacteriana permite mantener una expresión basal de hemolina debido a la presencia de esta flora.

8. CONCLUSIONES

- “ Se observó la expresión del gen de hemolina en el intestino de la colonia de *Plodia interpunctella* resistente a *Bacillus thuringiensis*, mientras que la expresión de hemolina sólo se había reportado en tejido graso y epidermis, tal y como se encontró en la colonia susceptible.

- “ La sobreexpresión de genes relacionados a bacterias de la familia Enterobacteriaceae y el aislamiento e identificación de las mismas presentes en el intestino de la colonia susceptible a *B. thuringiensis* y la colonia resistente sin exponer, indica que una mayor carga bacteriana incrementa la susceptibilidad al bioinsecticida o que se ve disminuida por la presencia de éste.

- “ Entre las colonias evaluadas se observó una relación entre una menor carga bacteriana con una menor producción de hemolina en intestino medio, lo que podría indicar la actividad antibacteriana de la hemolina y observada en contenido intestinal de la colonia resistente.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, Z., Saleemuddin, M. y Siddi, M. 1976. Alkine protease in the larvae of the worm. *Spodoptera litura*. Insect Biochem. **6**, 501-505.
- Andersson, K. y Steiner, H. 1987. Structure and properties of protein P4, the major bacteria-inducible protein in pupae of *Hyalophora cecropia*. Insect Biochem. **17**, 133-140.
- Arias, V. 1993. Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/X5030S/x5030S00.htm#Contents>
- Aye, t. t., Lee, K.-Y. y Kwon, Y. J. 2004. Cloning of immune protein hemolin cDNA from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, and its high induction during development and by bacterial challenge. Entomol. Res. **34**, 269-275.
- Aye, T. T., Shim, J-K, Rhee, I-K y Lee, K-Y. 2008. Up-regulation of the immune protein gene hemolin in the epidermis during the wandering larval stage of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. J Insect Physiol. **54**, 1301-1305.
- Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F. y Widmer, F. 2007. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. FEMS Microbiol. Ecol. **59**, 600-610.
- Bae, S. y Kim, Y. 2004. Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. Comp. Biochem. Physiol. **138A**, 396-444.
- Barillas-Mury, C., Bettencourt, R., Terenius, O. y Faye, I. 2002. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. Insect Mol. Biol. **11**, 267-271.
- Bettencourt, R., Gunne, H., Gastinel, L., Steiner, H., Faye, I. 1999. Implications of hemolin glycosylation and Ca²⁺-binding on homophilic and cellular interactions. J. Biochem, **266**, 964-976.
- Bettencourt, R., Lanz-Mendoza, H., Roxstrom-Lindquist, K., Faye, I. 1997. Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. J. Biochem. **250**, 630-637.
- Bettencourt, R., Assefaw-Redda, Y., Faye, I. 2000. The insect immune protein hemolin is expressed during oogenesis and embryogenesis. Mech. Develop. **95**, 301-304.
- Bettencourt, R., Terenius, O., Faye, I. 2002. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia pupae* is lethal to next generation embryos. Insect Biochem. Mol. Biol. **11**, 267-271.
- Boman, H. G., Mangonia M. L., Simmacoac, M. y Mignocnac, G. 1996. Effect of glucocorticoids on the synthesis of antimicrobial peptides in amphibian skin. FEBS LETTERS. **416**, 273-27.
- Brahmachary, M., Krishnan, S., Koh, J., Khan, A., Seah, S., Tan, T., Brusica, V. y Bajic, V. 2004. ANTIMICROBIAL: a database of antimicrobial sequences. Nucleic Acids Res. **32**, 586-589.
- Broderick, N., Raffa, K., Goodman, R. y Handelsman, J. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture independent methods. Appl. Environ. Microbiol. **70**, 293-300.
- Broderick, N., Raffa, K. y Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. PNAS, USA. **41**, 15196-15199.

- Broderick, N., Raffa, K.F., y Handelsman, J. 2010. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *BMC Microbiol.* **10**, 129.
- Broderick, N., Robinson, C., McMahon, M., Holt, J., Handelsman, J. y Raffa, K. 2009. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biology.* **7**,11.
- Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J., Lambert, J., Reichhart, J., Hoffmann, D., Hetru, C. y Hoffmanns, J. 1991. Insect immunity, isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J. Biol. Chem.* **36**, 24520-24525.
- Candas, M., O. Loseva, B. Oppert, P. Kosaraju y L. A. Bulla, Jr. 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the Indianmeal moth larval gut Proteome. *Mol. Cell. Proteomics.* **2**, 19-28.
- Casini, C., y Santa, D. 2005. Control alternativo de plagas en granos. Disponible en: <http://www.planetasoja.com/trabajos/trabajos800.php?id1=5110&id2=5118&publi=&idSec=1>
- Chain PS, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, et al. 2004. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**,13826e31.
- Cheng, Z-Y, Kramer, K. J., Oppert, B. y Dowdy, A. K. 2000. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem, Mol. Biol.* **30**, 215-224.
- Chernysh, S., Kim, S., Bekkers, G., Pleskach, V., Filatova, N., Anikin, V., Platonov, V. y Bulet, P. 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **20**, 12628612632
- Christeller, J. T., Laing W. A. Markwick N. P. y Burgess E. P. J. 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**, 735-746.
- Dai, S. y Gill S. S. 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 273-283.
- Daffre, S. y Faye, I. 1997. Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig-superfamily. *FEBS Letters.* **408**, 1276130.
- Dunn, P. E., Bohnart, T. J. y Russel, V. 1994. Regulation of antibacterial protein synthesis following infection and during metamorphosis of *Manduca sexta*. *In: Beck, G., Copper, L., Habicht, G. S., Marchalonis, J. J. (Eds.), Primordial Immunity: Foundations for the vertebrate Immune System*, vol. 712. *Ann New York Academy of Science*, pp. 1176130.
- ECONEX Sanidad Agrícola S. L. 1998. Plagas de Productos Almacenados. España. Disponible en: <http://www.e-econex.com/catalogo/cultivos11.htm>.
- Eleftherianos, I., Gökçen, F., Felföldi, G., Millichap, P.J., Trenczek, T.E., Ffrench, R. H. y Reynolds, S. E. 2007. The immunoglobulin family protein hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. *Cel. Microbiol.* **9**, 113761147.

- Engelhard, E. K. y Volkman L. E.. 1995. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M Nuclear Polyhedrosis virus. *Virology*. **209**, 384-389.
- Erickson, D.L., Russell, C.W., Johnson, K.L., Hileman, T., y Stewart, R.M. 2011. PhoP and OxyR transcriptional regulators contribute to *Yersinia pestis* virulence and survival within *Galleria mellonella*. *Microbial Pathogenesis*, **51**, 389-395.
- Estada, U. y Ferré, J. 1994. Binding of insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3840-3846.
- Fabrick, JA, Baker, JE, y Kanost, MR. 2003. cDNA cloning, purification, properties, and function of a α -1,3-glucan recognition protein from a pyralid moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 579-594.
- Faye, I. y Kanost, M. R. 1998. Function and regulation of hemolin. *En: Brey, P. T. and D. Hultmark (Ed.), Molecular Mechanisms of Immune Response in Insects.* Chapman and Hall, London, pp. 173-188.
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M. D., Tato, A. y Martínez, R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **42**, 51663.
- Galán-Wong, L. J., Rodríguez-Padilla, C., Luna Olvera H. 1996. Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*: Control de insectos y ácaros. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. pp. 13-19.
- Garrison, R. 2006. Polilla de la fruta seca (*Plodia interpunctella*). Agricultural Commissioner/Weights & Measures Department. South Gate, California. Disponible en: http://www.higieneambiental.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=75
- Gerdin, P. 2005. Control Biológico, una herramienta en la agricultura nacional. Centro de Desarrollo Medioambiental Universidad Central. Disponible en: <http://www.sustentable.cl/portada/Reportajes/4516.asp>
- Giles, K. L., Hellmich, R. L., Iverson, C. T. y Lewis, L. C. 2000. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize grain on *B. thuringiensis*-susceptible *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **93**, 1011-1016.
- Guardián, G. y Sibaja C. 2003. Manual para el control de plagas en plantas procesadoras de alimentos para el consumo humano. Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección de Salud Animal Departamento de Servicios Zoonosarios Internacionales Inspección de Carnes Costa Rica. Cry1A
- Gorman, M. J., Kankanala, P. y Kanost, M. R. 2004. Bacterial challenge stimulates innate immune responses in extra-embryonic tissues of tobacco hornworm eggs. *Insect Mol. Biol.* **13**, 19624.
- Griffitts, J. S. y Aroian, R. V. 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays*. **27**, 6146624.

- Gupta, A. K., Nayduch, D., Verma, P., Shah, B., Ghate, H. V., Patole, M. S. y Shouche, Y. S. 2012. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**, 581-6593.
- Hara, S. y Yamakawa, M. 1995. Moricin, a novel type of antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.- Japón.* **310**, 651-656.
- Hernández-Martínez, P., B. Naseri, G. Navarro-Cerrillo, B. Escriche, J. Ferré, S. Herrero. 2010. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Microbiology.*
- Herrero, S., Oppert, B., Ferré, J. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1085-1089.
- Huang, F., Buschman, L. L., y Higgins, R. A. 1999. Susceptibility of different instars of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to diet containing *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **92**, 547-550.
- Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Kapur, R. y Boman, H. 1982. Insect Immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. *European J. Biochem. Estocolmo*, **127**, 207-217.
- Ibrahim, A.M.A., Choi J.Y., Je Y.H. y Kim Y. 2005. Structure and expression profiles of two putative *Cotesia plutellae* bracovirus genes (CpBV-H4 and CpBV-E94a) in parasitized *Plutella xylostella*. *J. Asia-Pacific Entomol.* **8**, 359-366.
- Johnson, D. E., McGaughey, W. H. y Barnett, B. D. 1991. Small scale bioassay for the determination of *Bacillus thuringiensis* toxicity toward *Plodia interpunctella*. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 159-165.
- Johnson, D. E., Oppert, B., McGaughey, W. H. 1998. Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the indianmeal moth (*Plodia interpunctella*). *Cur. Microbiol.* **36**, 278-282.
- Johnston, P. R., y Crickmore, N. 2009. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5094-65099.
- Karumbaiah, L., Oppert, B., Jurat, F. y Adang, M. 2007. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **146**, 139-146.
- Kim, R., Jo, Y., Oh, S., Park, C., Noh, M., Lee, H., Kim, S., Lee, Y., Kim, I., Han, Y. 2010. Cloning and expression pattern of a hemolin homologue from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Genes & Genomics.* **32**, 71- 77.
- Kim, C-H., Park, J-W., Ha, N-C., Kang, H.J. y Lee, B.L. 2008. Innate immune response in insects: recognition of bacterial peptidoglycan and amplification of its recognition signal. *BMB reports.* **41**, 93-101.
- Kwon, B. y Kim, Y. 2008. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **101**, 36-41.
- Lanz-Mendoza, H. y I. Faye, 1999. Physiological aspects of the immunoglobulin superfamily in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 359-374.

- Larrain, P. 1994. Manejo Integrado de plagas en granos almacenados. Investigación y Progreso Agropecuario IPA La Platina. **81**, 10-16.
- Lecadet, M. M. y Dedonder, R. 1967. Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. 1. Preparation and fractionation of the lysates. J. Invertebr. Pathol. **9**, 310-321.
- LeOra, Software. 2007. POLO-PC plus. Berkeley, CA.
- Li, H., y Bower, G. 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. J. Invertebr. Pathol. **109**, 110-116.
- Lindstrom-Dinnetz, I., Sun, S. C. y Faye, I. 1995. Structure and expression of hemolin, an insect member of the immunoglobulin gene superfamily. Eur. J. Biochem. **230**, 920-925.
- Mak, P., Chmiel, D. y Gacek, G. 2001. Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*. Acta Biochim. Polonica. **48**, 1191-1195.
- Martinez-Valenzuela, M., Damas, G., Iracheta-Cárdenas, M., Valadéz-Lira, J.A., Jalomo-Ortíz K.P., Pietrantonio, P., Blanco, C., Gómez-Flores, R. y Tamez-Guerra, P. 2012. Humoral Immune-response and enzymatic activity by *Heliothis virescens* after *Bacillus thuringiensis* exposure. Biotechnology SUMMIT-2012. International Foundation for Biotechnology Research. March 18-21, Mérida, Yuc. MX. Pp 114-120. ISBN: 978-607-9023-12-6.
- Matsuda, K., Tsuji, H., Asahara, T., Kado, Y. y Nomoto, K. 2007. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. **73**, 32639.
- McGaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science. **229**, 193-195.
- McGaughey, W. H. y Beeman, R. W. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. **81**, 28-33.
- McGaughey, W. H. y Johnson, D. E. 1992. Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) resistance to different strains and mixtures of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. **85**, 1594-1600.
- McGaughey, W. H. y Johnson, D. E. 1994. Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strains on cross-resistance in Indianmeal moths (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. **87**, 532-540.
- McNeil, J., Cox-Foster, D., Gardner, M., Slavicek, J., Thiem, S., y Hoover, K. 2010. Pathogenesis of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* and mechanisms of developmental resistance. J. Gen. Virol. **91**, 1590-1600.
- Milne, R. y Kaplan, H. 1993. Purification and characterization. Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Mol. Biol. **23**, 663-673.
- Mohandass, S., Arthur, F.H., Zhu, K.Y. y Throne, J.E. 2007. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. J. Econ. Entomol. **43**, 302-311.
- Montaño, P. y Vargas, A. 2002. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. Caracas, Venezuela. Redalyc **27**, 21-27. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/339/33906404.pdf>

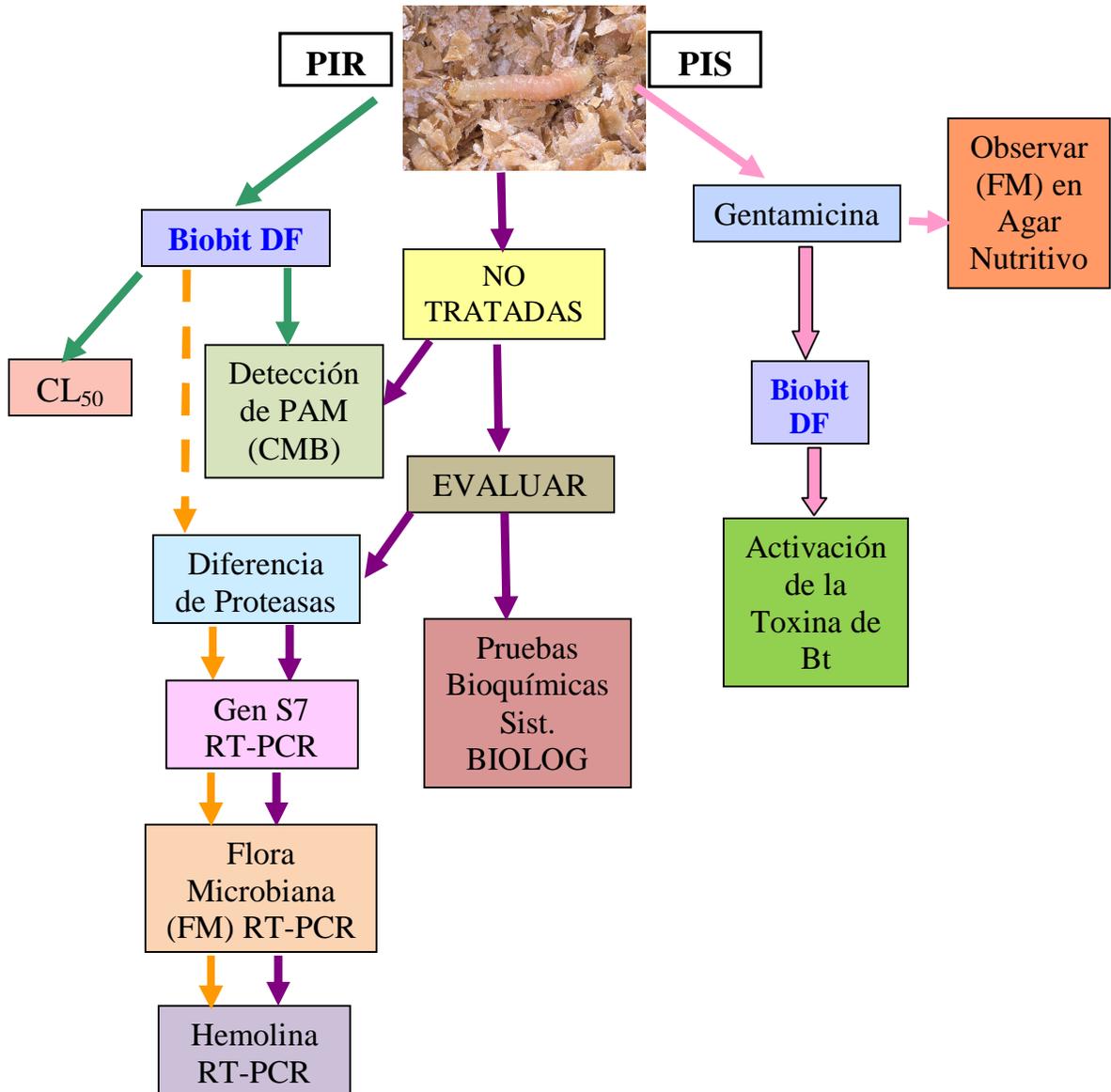
- Nwanze, K. F., Partida, G. J. y McGaughey, W. H. 1975. Susceptibility of *Cadra cautella* and *Plodia interpunctella* to *Bacillus thuringiensis* on wheat. *J. Econ. Entomol.* **68**, 751-752.
- Oppert, B. 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives Insect Biochem. Physiol.* **42**, 1612.
- Oppert, B. 2006. Two-dimensional analysis of proteinase activity. *J. Biochem. Biophys. Met.* **67**, 1736179.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D.E., MacIntosh, S.C. y McGaughey, W.H. 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **198**, 940-947.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D., Upton, S.J. y McGaughey, W.H. 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxina. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 571-583.
- Ramayo, L. 1983. Tecnología de granos. Departamento de industrias agrícolas. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp. 216.
- Rivas, S., Sada, E., Hernández, P. y Tsutsumi, V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*. Cuernavaca, Morelos, México. Disponible en: http://scielo.unam.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342006000100010&lng=es&nrm=iso
- Sansinenea, R. 2002. *Bacillus thuringiensis*: Una alternativa biotecnológica a los insecticidas. Puebla, México. Disponible en: <http://hosting.udlap.mx/profesores/miguela.mendez/alephzero/archivo/historico/az29/stebaliz.html>
- Sedlacek, J.D., Komaravalli, S.R., Hanley, A.M., Price, B.D. y Davis, P.M. 2001. Life history attributes of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) and Angoumois grain moth (Lepidoptera: Gelechiidae) reared on transgenic corn kernels. *J. Econ. Entomol.* **94**, 586-592.
- Serna, S. 1996. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT Editores. México. Pp. 521.
- Shrestha S. y Kim, Y. 2009. Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2077-2084.
- Silva, A. 2002. Control orgánico de plagas de los granos almacenados. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Disponible en: www.chillan.udec.cl/c_ahora/Revista17/07ControlOrganicoDeGranos.pdf
- Su, X.D., Gastinel, L.N., Vaughn, D.E., Faye, I., Poon, P., y Bjorkman, P. J. 1998. Crystal structure of hemolin: a horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science.* **281**, 991-995
- Tamez-Guerra, P., Valadez-Lira, J. A., Alcocer-González, J.M., Oppert, B., Gómez-Flores, R., Tamez-Guerra, R., y Rodríguez-Padilla, C. 2008. Detection of genes encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* (Hübner) exposed to *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **98**, 218-227.

- Terenius, O., Bettencourt, R., Lee, S.Y., Li, W., Söderhäll, K., Faye, I., 2007. RNA interference of hemolin causes depletion of phenoloxidase activity in *Hyalophora cecropia*. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 571-575.
- Terenius, O., Popham, H. J.R. y Shelby, K. S. 2009. Bacterial, but not baculoviral infections stimulate Hemolin expression in noctuid moths. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 1176-1185.
- Tojo, A. y Aizawa, K. 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombix mori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 576-580.
- Tojo, A., Samasanti, W., Toshida, N. y Aiwaza, K. 1986. Effects of the three proteases from gut juice of the silkworm, *Bombyx mori*, on the two morphologically different inclusions of δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD-1 strain. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 575-580.
- Valadez-Lira, J. A., J. M. Alcocer-Gonzalez, G. Damas, G. Nuñez-Mejía, B. Oppert, C. Rodríguez-Padilla y P. Tamez-Guerra. 2012. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different developmental stages of Lepidopteran pests. *J. Insect Sci. (JIS-1468-10)*. In press.
- Vallet-Gely, I., Lemaitre, B., y Boccard, F. 2008. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat. Rev. Micro.* **6**, 302-313.
- Van-Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D. y Mellaert, H. V. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science.* **247**, 72-74.
- Villarruel, F., Huizar, L., Corrales, M., Sánchez, T. e Islas, R. 2004. Péptidos antimicrobianos escudo esencial de la respuesta inmune. *Investigación en salud.* **4**, 170-179.
- Vilmos, P. y Kurucz, E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Let.* **62**, 59-66.
- Viñas, N., Teixidó, M., Abadías, R. y Torres, J. 2003. Control biológico de podredumbres fúngicas en poscosecha de fruta. Estado actual y perspectivas. *Boletín de Agroinformación Unidad de Patología. Área de Postcollita*. Disponible en: <http://www.agroinformacion.com/leer-articulo.aspx?not=152>.
- Wang, P., J-Z Zhao, A. Rodrigo-Simón, W. Kain, A.F. Janmaat, A. M. Shelton, J. Ferré y J. Myers. 2007. Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1199-1207.
- Worthen, P. L., Gode, C. J., y Graf, J. 2006. Culture-independent characterization of the digestive-tract microbiota of the medicinal leech reveals a tripartite symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4775-4781.
- Yu, X. Q. y Kanost, M. R. 1999. Developmental expression of *Manduca sexta* hemolin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **42**, 198-212.
- Zhu, Y.-C., Kramer K.J., Dowdy A.K. y Baker J.E. 2000a. Trypsinogen-like cDNAs and quantitative analysis of mRNA levels from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 1027-1035.
- Zhu, Y., Kramer, K., Oppert, B., Dowdy, A. 2000b. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 215-224.

Zhou, W., Russell, C. W., Johnson, K. L., Mortensen, R. D., Erickson, D. L. 2012. Gene expression analysis of *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae) suggests a role for reactive oxygen species in response to *Yersinia pestis* infection. J. Med. Entomol. **49**, 364-370.

ANEXO 1

Diagrama de la Estrategia Experimental.



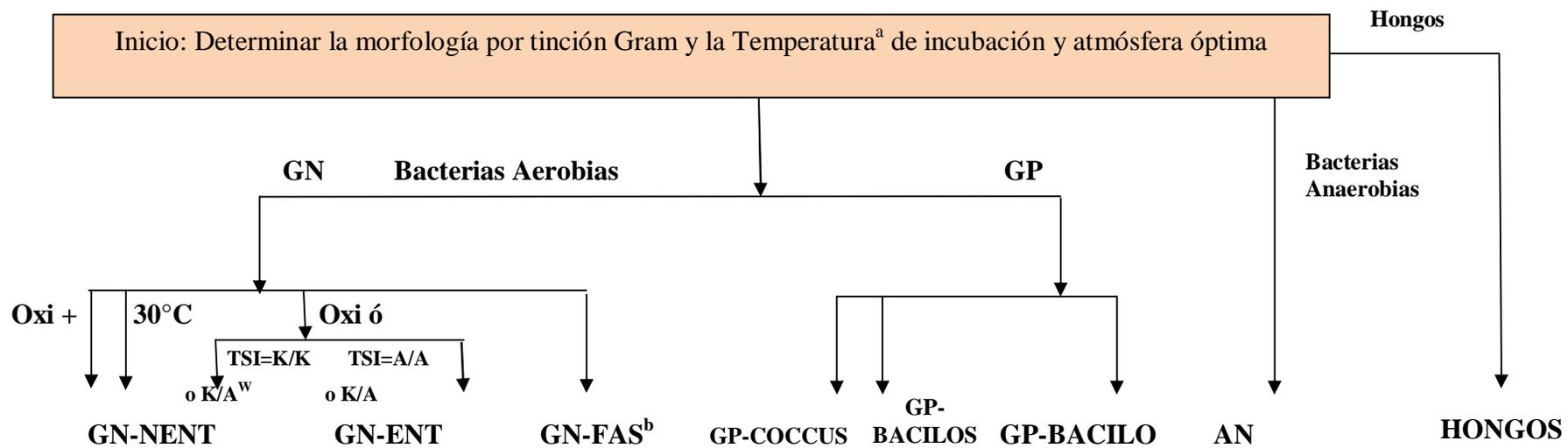
ANEXO 2

Resumen de Procedimientos y Excepciones de las Pruebas Bioquímicas.

Tipo de microbio	GN-NENT	GN-ENT	GN-FAS	Excepciones
Medio de Cultivo	BUG+ B o TSA+B	BUG+B TSA+B	Chocolate	GN-NENT: <i>Vibrio</i> debe crecer en BUG+B géneros agrícolas (ej. <i>Acidovorax</i> , <i>Brenneria</i> , <i>Burkholdena</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Delftia</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Xanthomonas</i>) tal vez crezcan en BUG sin sangre
Temperatura	30 °C	35-37 °C	35-37 °C	GN-NENT: Usar 35-37°C para especies de los sistemas cardio y respiratorio (ej. <i>Bordetella</i> , <i>Cardiobacterium</i> , <i>Mannheimia</i> , <i>Oligella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Riemerella</i> , <i>Rhizobium</i> y <i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>). Usar 26° C para <i>Janthinobacterium</i> y <i>Vibrio splendidus</i> . GN-ENT: Usar 30 °C para especies de medio ambiente frío (<i>Edwardsiella ictaluri</i> , <i>Brenneria</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Photorhabdus</i> , <i>Xenorhabdus</i>)
	Aire	Aire	6.5% CO ₂	
Atmósfera Fluido de Inoculación	GN/GP-IF	GN/GP-IF+ tioglicolato	GN/GP-IF+ tioglicolato	GN-NENT: Usar tioglicolato con cepas òfalso positivoö (ej. <i>Chryseobacterium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Sphingomonas</i> y <i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>). GN-ENT: No usar tioglicolato para <i>Brenneria</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Photorhabdus</i> y <i>Xenorhabdus</i> . GN-FAS: No usar tioglicolato para <i>Francisella</i> y <i>Brucella</i> .
Turbidez del Inóculo	52% T	61% T	20% T	
Inóculo por pozo	150 µL	150 µL	150 µL	
Tiempo de Incubación	4-6, 16-24 h	4-6, 16-24 h	4-6, 16-24 h	

ANEXO 3

Inicio: Determinar la morfología por tinción Gram y la Temperatura^a de incubación y atmósfera óptima



	GN-NENT	GN-ENT	GN-FAS ^b	GP-COCCUS	GP-BACILO	AN	HONGOS
Medio de Cultivo	BUG+B o TSA+ B ^C	BUG+B o TSA+ B ^C	CHOC	BUG+B ^C	BUG+M+T	BUA+B	BUY
Atmósfera	Aire	Aire	6.5% CO ₂	Aire/6.5% ^d CO ₂	Aire	Anaerobiosis ^e	Aire
Temperatura	30° C	35-37° C	35-37° C	35-37° C	30° C	35-37° C	26° C
Fluido de Inoculación	GN/GP-IF ^f	GN/GP-IF+ T	GN/GP-IF+T	GN/GP-IF+T ^g	GN/GP-IF	AN-IF	Agua
Inóculo %T	52% T	63% T	20% T	20% T	28% T	63% T	47% T
Microplaca- µL/ pozo	GN2- 150 µL	GN2- 150 µL	GN2- 150 µL	GP2- 150 µL	GP2- 150 µL	AN- 100 µL	Hongo - 150 µL
Tiempo de Incubación (h)	4-6, 16-24	4-6, 16-24	4-6, 16-24	4-6, 16-24	4-6, 16-24	20-24	24, 48, 72

ANEXO 3 (continuación)

- a) Con excepción de los termófilos, todas las especies crecen entre 26° C, 30-37° C.
- b) Se requiere chocolate o CO₂ para el crecimiento o la formación de colonias < 1 mm en BUG + B.
- c) Especies agrícolas podrán cultivarse en medio BUG sin sangre.
- d) Aire, al menos CO₂ se requiere para el crecimiento.
- e) AN Microplaca deben ser incubados en una atmósfera anaerobia, libre de hidrógeno.
- f) Si el pozo control (A1) es positivo, agregar tioglicolato al fluido de inoculación.
- g) Si el pozo control (A1) es positivo, agregar salicilato junto con tioglicolato al fluido de inoculación.
- h) Abreviaturas: Oxi = Oxidasa; TSI = Triple sugar iron inclinado; A = Ácido, A^w = Ligeramente ácido; K = alcalino; BUG= Biolog Universal Growth; B= blood; TSA = Tripticasa soya agar; CHOC = chocolate agar.