

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IMPACTO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE *Plodia interpunctella* EN SU
RESPUESTA INMUNE Y SUSCEPTIBILIDAD A *Bacillus thuringiensis*

POR

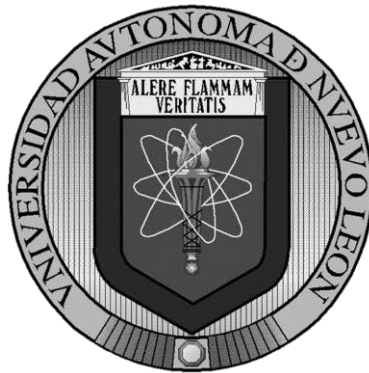
BIÓL. ALONSO ALBERTO OROZCO FLORES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

DICIEMBRE, 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IMPACTO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE *Plodia interpunctella* EN SU
RESPUESTA INMUNE Y SUSCEPTIBILIDAD A *Bacillus thuringiensis*

Por


BIÓL. ALONSO ALBERTO OROZCO FLORES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Diciembre, 2013

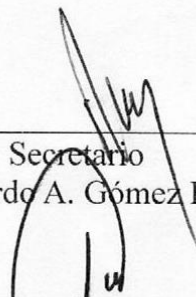
IMPACTO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE *Plodia interpunctella* EN SU
RESPUESTA INMUNE Y SUSCEPTIBILIDAD A *Bacillus thuringiensis*

COMITÉ DE TESIS




Director

Dra. Patricia Tamez Guerra



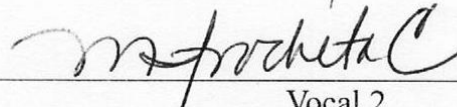
Secretario

Dr. Ricardo A. Gómez Flores



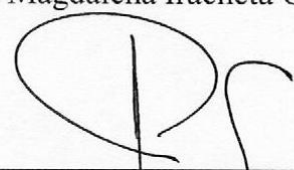
Vocal 1

Dr. Juan M. Alcocer González



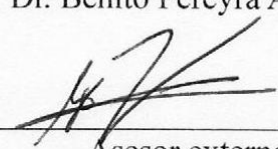
Vocal 2

Dra. Magdalena Iracheta Cárdenas



Vocal 3

Dr. Benito Pereyra Alférez



Asesor externo

Dr. José Alberto Valadez Lira

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres: Andrés Arturo Orozco González y Martha Alicia Flores Rocha, que siempre me han apoyado, tanto en el ámbito personal como profesional. Así mismo, hacer un reconocimiento al resto de mi familia con la que siempre he contado, especialmente a mi tía Martha Orozco González, que ha sido un importante respaldado en el crecimiento de mi profesión. Así como a mi novia que ha sido un modelo académico a seguir y me ha acompañado durante la maestría.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra y Dr. José Alberto Valadez Lira por su constante apoyo e invaluable enseñanzas que hicieron posible la realización de esta tesis. También una mención al resto de mi comité de tesis por la revisión de la misma y/o asistencia a seminarios de posgrado.

Por otra parte agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

También un personal agradecimiento por el apoyo brindado por mis compañeros de laboratorio, así como los alumnos que me asistieron en diversas etapas del desarrollo de este proyecto.

Finalmente y no menos importante, agradezco a mis amigos nuevos y viejos por todas esas horas de sana recreación.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Respuesta Inmune en Insectos	4
2.1.1 Proteínas receptoras de reconocimiento.....	5
2.1.1.1 Inmunoelectinas	6
2.1.1.2 Proteínas de reconocimiento de peptidoglicano	6
2.1.1.3 Proteínas reconocedoras de β 1,3-glucano	6
2.1.1.4 Integrinas	7
2.1.1.5 Hemolina	7
2.1.2 Respuesta Humoral	8
2.1.2.1 Péptidos Antimicrobianos.....	8
2.1.2.2 Fenol oxidasa.....	8
2.1.3 Respuesta celular.....	9

2.1.3.1 Fagocitosis	10
2.1.3.2 Nodulación	10
2.1.3.3 Encapsulación.....	11
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	11
2.2.1 Toxinas Cry	12
2.2.2 Modo de Acción de toxinas Cry.....	12
2.2.3 Respuesta inmune de insectos expuestos a Bt.....	14
2.2.4 Resistencia de insectos a toxinas Cry.....	14
2.3 Comunidad microbiana intestinal en insectos	15
2.4 Ficha técnica de <i>Plodia Interpunctella</i> (Hübner)	17
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo General.....	20
4.2 Objetivos Específicos	20
5. Metodología.....	21
5.1 Insectos	21
5.2 Evaluación de la susceptibilidad de <i>Plodia interpunctella</i> al insecticida Bactospeine® DF.....	21
5.3 Erradicación de microbiota intestinal de <i>P. interpunctella</i>	22
5.3.1 Erradicacion de Microbiota intestinal mediante antibióticos.....	22
5.3.2 Preparacion de huevecillos de <i>P. interpunctella</i> libres de bacterias.....	22
5.3.3 Detección de presencia/ausencia de microbiota de larvas tratadas con antibióticos y desinfección con cloro.....	23

5.4	Análisis de la respuesta inmune de <i>P. interpunctella</i>	23
5.4.1	Estandarización para el análisis de respuesta inmune en <i>P. interpunctella</i> ..	24
5.4.1.1	Evaluación de transcritos del gen <i>hemolina</i>	24
5.4.1.2	Análisis de la actividad fenol oxidasa	25
5.4.1.3	Conteo de hemocitos	26
5.4.1	Evaluación de la Respuesta Inmune basal de <i>Plodia interpunctella</i>	26
5.4.2	Efecto de diferentes antibióticos en la respuesta inmune de <i>P. interpunctella</i>	26
5.5	Susceptibilidad de <i>P. interpunctella</i> a Bt bajo diferentes estados de microbiota intestinal.....	27
5.5.1	Comparación de la susceptibilidad a Bt de <i>P. interpunctella</i> tratada con antibióticos.	27
5.5.2	Comparación de la susceptibilidad a Bt de <i>P. interpunctella</i> desinfectadas desde huevecillos y mantenidas en condiciones de esterilidad.....	28
5.6	Identificación de la microbiota del intestino de <i>P. interpunctella</i> mediante secuenciación del gen ARNr 16S.....	28
5.6.1	Amplificación por PCR del gen 16S ARNr de comunidades bacterianas del intestino de <i>P. interpunctella</i>	28
5.6.1.1	Preparación de muestra de intestinos de larvas	28
5.6.1.2	Amplificación por PCR del gen ARNr 16S.....	29
5.6.2	Clonación y secuenciación del producto de PCR	29
5.6.2.1	Purificación de producto de PCR del gen del ARNr 16S a partir de gel de agarosa.	29
5.6.2.2	Ligación en vector pGEM-T Easy.....	30

5.6.2.3 Transformación en <i>E. coli</i> TOP-10 calcio-competentes.....	31
5.6.2.4 Secuenciación.....	32
5.6.3 Análisis de secuencias.....	32
5.6.3.1 Edición de secuencias y búsqueda de secuencias de referencia.	32
5.6.3.2 Clasificación taxonómica de las secuencias.....	33
5.6.4 Filogenia de microbiota intestinal comparada con las secuencias de referencia.....	33
5.6.4.1 Alineación y ajuste de secuencias.....	33
5.6.4.2 Análisis Filogenético.	33
6. Resultados.....	35
6.1 Evaluación de la susceptibilidad de <i>P. interpunctella</i> al insecticida Bactospeine® DF.....	35
6.2 Detección de presencia/ausencia de microbiota intestinal de larvas tratadas con antibióticos.....	35
6.2.1 Unidades formadoras de colonias.	35
6.2.2 Validación por PCR de gen ARNr 16S.....	36
6.3 Evaluación de la respuesta inmune basal de <i>P. interpunctella</i>	37
6.3.1 Actividad fenol oxidasa.....	37
6.3.2 Detección de transcritos de <i>hemolina</i>	38
6.4 Efecto de diferentes antibióticos en la respuesta inmune de <i>P. interpunctella</i> ...	38
6.5 Respuesta inmune en larvas mantenidas en condiciones de esterilidad desde huevecillo.....	40
6.6 Comparación de la susceptibilidad a Bt de <i>P. interpunctella</i> tratada con antibióticos.....	42

6.6.1 Evaluación de respuesta inmune de <i>P. interpunctella</i> en los diferentes tratamientos de antibióticos y Bt.....	43
6.6.1.1 Análisis de actividad fenol oxidasa	43
6.6.1.2 Conteo de hemocitos	44
6.6.1.3 Detección de transcritos de <i>hemolina</i>	45
6.7 Susceptibilidad a Bt de larvas mantenidas estériles desde huevecillo.....	46
6.8 Identificación de la microbiota del intestino de <i>P. interpunctella</i> mediante secuenciación del gen ARNr 16S.....	47
7. Discusión	51
8. Conclusiones	57
9. Literatura Citada.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Carga bacteriana de intestinos de <i>Plodia interpunctella</i> tratada con distintas concentraciones de antibióticos en dieta artificial.	36
Tabla 2. Resultado de identificación a nivel de género de las clonas en base al <i>Ribosomal Database</i>	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema General de Inmunidad de Insectos.....	5
Figura 2. Mecanismo general del modo de acción de las toxinas Cry de Bt	13
Figura 3. Diferentes estadios del ciclo de vida de <i>Plodia interpunctella</i>	18
Figura 4. Mapa de plásmido pGEM [®] -T Easy con sus puntos de resticcion	30
Figura 5. Promotor y secuencias de clonacion múltiple del vector pGEM [®] -T Easy	31
Figura 6. Caja de Petri donde se realizaron los bioensayos de susceptibilidad a Bt.....	35
Figura 7. Detección por PCR de genes bacterianos de ARNr 16S en intestino de larvas del tercer estadio de <i>P. interpunctella</i> tratadas con diferentes concentraciones de antibióticos.....	36
Figura 8. Actividad fenol oxidasa en los diferentes estadios del ciclo de vida de <i>Plodia interpunctella</i>	37
Figura 9. Detección de transcritos de <i>hemolina</i> normalizada con el gen constitutivo S7.	38
Figura 10. Actividad fenol oxidasa de larvas del tercer estadio de <i>P. interpunctella</i> tratadas con los diferentes antibióticos.	39
Figura 11. Número de hemocitos promedio de larvas de tercer estadio de <i>P. interpunctella</i> tratadas con dosis no inhibitorias de la microbiota de cada antibiótico por separado.....	40
Figura 12. Comparación de número de hemocitos por mL de larvas mantenidas en condiciones de esterilidad desde huevecillo y control..	41
Figura 13. Detección de transcritos de <i>hemolina</i> en larvas desinfectadas desde huevecillo y mantenidas bajo condiciones de esterilidad..	42
Figura 14. Porcentaje de mortalidad de larvas expuestas a Bt y antibióticos..	43
Figura 15. Actividad fenol oxidasa en hemolinfa de larvas bajo diferentes tratamientos Antibióticos-Bt.....	44
Figura 16. Número de hemocitos por mL hemolinfa de larvas bajo diferentes tratamientos antibióticos-Bt.	45

Figura 17. Detección de transcritos de <i>hemolina</i> en base al análisis de densitometría y normalización con el gen constitutivo.....	46
Figura 18. Susceptibilidad a Bt de larvas estériles desde huevecillo.....	47
Figura 19. Porcentaje de clonas pertenecientes a cada filo de bacterias.....	49
Figura 20. Agrupación filogenética de las secuencias bacterianas obtenidas del ARNr 16S de intestino de <i>P. interpunctella</i> y las secuencias de referencia.	50

NOMENCLATURA

ADN	Ácido ribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido desoxirribonucleico
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
βGRPs	Proteínas reconocedoras de β 1,3-glucano
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	Grados centígrados
CL₅₀	Concentración letal media
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dopa	Dihidroxi-fenilalanina
H	Índice de diversidad de Shannon-Wiener
IMD	Vías de inmunodeficiencia
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobases (mil bases)
LB	Medio Miller, Luria Bertani
L-Dopa	L-dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolisacáridos
min	Minutos

mL	Militro
mm	Milímetro
MMLV	Virus de la leucemia Moloney murina
MUSCLE	<i>Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
OTUs	Unidad taxonómica operacional
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGRP	Proteína reconocedora de peptidoglicano
PMAP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PO	Fenol oxidasa
PRP	Proteína reconocedora de patógeno
proPO	Profenol oxidasa
RI	Respuesta inmune
Rpm	Revoluciones por minuto
ARNr	ARN ribosomal

RT	Retro transcripción
Seg	Segundos
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades internacionales
μL	Microlitro
μM	Micromolar
UV	Ultravioleta
VIPs	Proteínas vegetativas insecticidas
V	Voltaje
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa

RESUMEN

El aumento en las poblaciones de insectos plaga genera fuertes pérdidas en la producción agrícola. El control de plagas inicialmente se enfocó al empleo de insecticidas químicos; sin embargo, estos han causado un considerable daño al medio ambiente y a la salud humana, por lo que dentro de las alternativas de control se están empleando biopesticidas como la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). El empleo de esta bacteria se ha dificultado por el potencial desarrollo de insectos resistentes, lo cual está relacionado en general con cambios en la actividad enzimática y en los receptores de toxinas Cry en el intestino. Recientes estudios sugieren que se requiere de la microbiota intestinal para la actividad insecticida de Bt y que la respuesta inmune de los insectos podría verse afectada por el bioinsecticida. Por ello, en este trabajo se analizó el efecto de las bacterias intestinales en la respuesta inmune y en la susceptibilidad a Bt en el lepidóptero *Plodia interpunctella*, una de las plagas de granos almacenados de mayor importancia a nivel mundial. Así mismo, se realizó una descripción de los géneros bacterianos de dicho ecosistema mediante el análisis de secuencias del ARNr 16S bacteriano del intestino de larvas del insecto. Nuestros resultados demuestran la importancia de las bacterias intestinales de *P. interpunctella* en la susceptibilidad a Bt, teniendo una mortalidad de un 21% al erradicar la microbiota respecto a un 60% de mortalidad en su estado normal (con microbiota). La ausencia de microorganismos en el intestino modificó la respuesta inmune basal, aumentando el número de hemocitos y disminuyendo la expresión de *hemolina*, lo cual retardó el proceso de metamorfosis del insecto. Las larvas expuestas a Bt presentaron una disminución en los siguientes factores de inmunidad evaluados: número de hemocitos, actividad fenol oxidasa y expresión de *hemolina*. En cuanto a la diversidad bacteriana del intestino, los principales géneros de bacterias encontrados fueron *Pseudomonas* con un 26%, *Achromobacter* 14%, *Methylobacterium* 11% y un 9% de *Propionibacterium*, que al igual que los hábitos alimenticios del insecto, su microbioma fue diferente al reportado para otros lepidópteros. Estos resultados nos permiten concluir que la microbiota de *P. interpunctella* es fundamental para mantener una respuesta inmune basal y ayuda a modular la expresión de la *hemolina*, la cual se requiere para la metamorfosis del insecto. Así también, Bt puede disminuir dicha respuesta y matar al insecto sin la presencia de otras bacterias; sin embargo, éstas aumentan su actividad insecticida.

ABSTRACT

The increase in insect pest populations has resulted in great agricultural production losses. Pest control initially was focused on chemical insecticides, but these have caused considerable damage to the environment and human health, leading to seek new control alternatives, as the biopesticide *Bacillus thuringiensis* (Bt). Nevertheless, Bt commercial products could result in insect resistant development, which has been related to intestinal enzyme activity and Cry toxin receptors changes. Recent studies suggested that intestinal microbiota is required for Bt insecticidal activity, and immune response by target insects could be affected by the biopesticide. Therefore, in this study we analyzed the effect of intestinal bacteria and immune response versus susceptibility to Bt in the Lepidoptera pest *Plodia interpunctella*. In addition, description of the bacterial genera within the larvae gut ecosystem was analyzed by 16S rRNA bacterial sequences. Our results demonstrated the importance of *P. interpunctella* intestinal bacteria to Bt susceptibility, showing as low as 21% mortality after microbiota eradication compared with 60% mortality in unaltered gut microbiota. The absence of gut microorganisms changed the basal immune response, increased hemocytes number and decreased *hemolin* expression. When *hemolin* expression was no longer observed, the insect metamorphosis process was reduced. Larvae exposed to Bt showed a decrease in the assessed immunity markers, such as hemocytes number, phenol oxidase activity and *hemolin* expression. Regarding the gut bacterial diversity, species of *Pseudomonas* were the major found genera (26%), followed by *Achromobacter* (14%), *Methylobacterium* (11%) and *Propionibacterium* (9%). This microbioma was different than that reported by other Lepidoptera, but insect feeding habits were different as well. Overall, it was concluded that *P. interpunctella* microbiota is essential to maintain healthy immune response and helps to modulate *hemolin* basal expression, important for insect metamorphosis. In addition, Bt exposure suppressed three insect's immune response markers and it was observed that Bt without gut microbiota may lead to a reduced *P. interpunctella* susceptibility to this bioinsecticide.

1. INTRODUCCIÓN

La clase Insecta representa el grupo más diverso del reino animal; ocupan casi todos los ambientes del planeta y es fundamental en los ecosistemas que habita. Además, constituye una de las clases con mayor interacción con las actividades humanas, ya sea de forma positiva, como la polinización de cultivos, la producción de miel y seda, o de manera negativa, como vectores de enfermedades y plagas agrícolas. La producción y uso excesivo de insecticidas químicos para el control de insectos plaga han causado un considerable daño al medio ambiente y a la salud humana. La agricultura sostenible y nuevas tendencias en alimentación recomiendan el empleo de organismos benéficos para controlar las poblaciones de dichos insectos plaga. Uno de estos biopesticidas ambientalmente amigables incluye a la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), un patógeno oportunista de insectos descubierto hace más de un siglo. La característica más destacada de esta bacteria es que puede producir inclusiones de cristales paraesporales que están compuestos por una o más δ -endotoxinas, que al digerirse resultan en la forma tóxica, que por su naturaleza cristalina se han denominado toxinas Cry. Cada una de ellas es específica para ciertos insectos, sobre todo a nivel de orden en insectos (Chattopadhyay *et al.*, 2004). En lepidópteros, la especificidad se debe en parte al ambiente extremadamente alcalino y a las proteasas del intestino medio, mismos que se requieren para disolver/digerir la protoxina a su forma activa, la cual se une a receptores de la superficie epitelial. Posteriormente, las toxinas se insertan en las membranas de las células del intestino, donde se forman poros que causan diarrea y parálisis intestinal del insecto susceptible (Garczynski *et al.*, 1991).

El producto comercial Bactospeine[®] DF (Valent BioSciences Corporation) cuyo ingrediente activo es Bt var *kurstaki* cepa HD-1, contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, y es recomendado para su uso como control biológico de *Plodia interpunctella* (Hübner) en alimentos almacenados. Sin embargo, el control de esta

plaga mediante la aplicación de bioinsecticidas a base de Bt puede estar comprometido, debido a la capacidad de desarrollar resistencia a toxinas Cry (McGaughey y Johnson, 1992; Yu-Cheng *et al.*, 2000; Candas *et al.*, 2003). Esta resistencia en muchas poblaciones de campo y laboratorio es causada por cambios en los receptores de toxinas Cry de Bt, lo cual reducen o inhiben la afinidad a la molécula receptora aminopeptidasa-N (Yu-Cheng *et al.*, 2000), así como a modificaciones en la actividad de la proteasa luminal quimiotripsina (Oppert *et al.*, 1996) y la enzima hidrolasa ligada a tripsina T1 (Oppert *et al.*, 1997).

Los microorganismos juegan un importante papel en el crecimiento y desarrollo de muchas especies de insectos. Contribuyen a la reproducción, digestión, nutrición y la producción de feromonas (Allen *et al.*, 2009). En algunas especies de lepidópteros susceptibles a Bt, se ha reportado que la eliminación de los microorganismos mediante antibióticos suministrados en dieta, ha reducido la susceptibilidad de los insectos al bioinsecticida (Broderick *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la toxicidad de Bt depende de una interacción con los microorganismos de la comunidad intestinal nativa.

La inmunidad en invertebrados está formada por componentes humorales y celulares mediados o estimulados por reconocimientos de componentes de superficie de microorganismos (Chan-Hee *et al.*, 2008). El componente humoral incluye péptidos antimicrobianos, enzimas líticas (lisozimas) y el proceso de melanización mediado por la actividad de la fenol oxidasa. Los componentes celulares incluyen la fagocitosis por los hemocitos circulantes (Chan-Hee *et al.*, 2008; Vizioli y Salzet, 2002), agregaciones celulares, formación de nódulos y encapsulación, en donde también interfiere la fenol oxidasa (Hoffmann, 1995).

El conocimiento de las bacterias intestinales de los lepidópteros y los papeles que pueden desempeñar los diferentes mecanismos de resistencia, incluyendo la respuesta inmune, podrían conducir a nuevas estrategias dirigidas al control de este lepidóptero, el cual constituye una plaga muy importante en granos y cereales (Oppert *et al.*, 2010).

Por lo anterior expuesto, en este proyecto nuestro objetivo fue determinar la relación entre la susceptibilidad de *P. interpunctella* a un producto comercial de Bt recomendado para su control, con su respuesta inmune y la presencia o ausencia de la comunidad bacteriana intestinal del mismo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Respuesta Inmune en Insectos

El estudio de la respuesta inmune (RI) en insectos es de suma importancia para la comprensión de la biología básica de éstos. El entendimiento de los mecanismos del sistema inmunitario y la etiología de las enfermedades, es aplicable a la búsqueda de nuevas estrategias que nos ayuden a potenciar la actividad de organismos entomopatógenos.

Las distinciones entre la RI en insectos y mamíferos son considerables, ya que los insectos carecen de un sistema adaptativo, no tienen anticuerpos ni células T, como ocurren en los vertebrados (Schmidt *et al.*, 2008).

La primer barrera para la entrada de microorganismos y agentes externos son las características físicas y químicas de la cutícula que evitan la entrada de microorganismos, seguido de una respuesta del sistema inmune del insecto que está constituido por las proteínas receptoras, que reconocen patrones moleculares de los patógenos; por una respuesta humoral, constituida por la expresión de péptidos antimicrobianos (PAMs) y cascadas enzimáticas de coagulación o melanización de la hemolinfa; y una respuesta celular, mediada por diferentes clases de hemocitos encargados de la fagocitosis, nodulación o encapsulación de los agentes invasores (Tsakas y Marmaras, 2010) como se muestra en la (Figura 1).

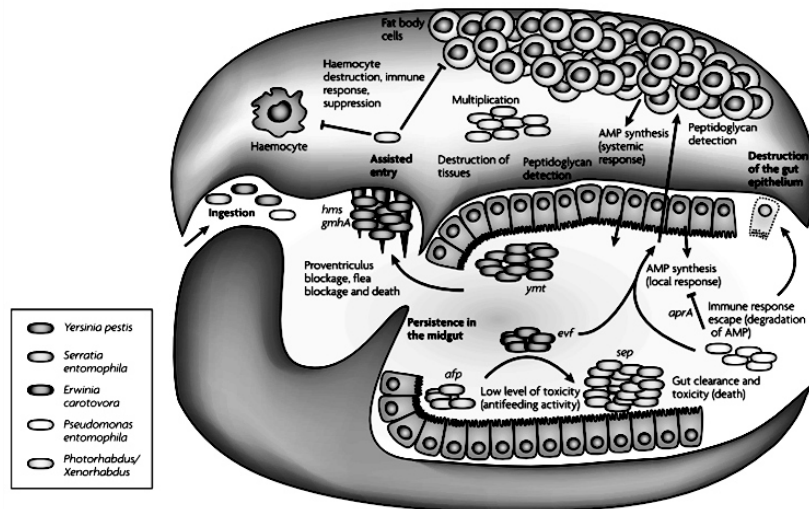


Figura 1. Esquema General de Inmunidad de Insectos (Vallet-Gely *et al.*, 2008)

2.1.1 Proteínas receptoras de reconocimiento

El primer paso de la respuesta inmune en insectos, ya sea humoral o celular, es el reconocimiento del patógeno, esto mediante proteínas reconocedoras de patógeno (PRPs) que se unen a los componentes estructurales altamente conservados en la superficie de los microorganismos y que no se encuentran en el huésped; conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos PAMP (Fabrick *et al.*, 2003). Los PRPs están presentes en la membrana plasmática de las células del cuerpo gordo, en los hemocitos o pueden estar disueltos en la hemolinfa (Tsakas y Marmaras, 2010). Los PAMP más identificados son los componentes de la pared celular, como los lipopolisacáridos (LPS) en bacterias Gram-negativas; el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano en Gram positivas; y β -1,3 glucanos en hongos (Marmaras y Lampropoulou, 2009).

2.1.1.1 Inmunolectinas

La superfamilia de lectinas que contiene dominios tipo-C dependientes (capaz de unirse a carbohidratos) son un amplio grupo de proteínas extracelulares en los metazoos con diversas funciones, incluyendo el reconocimiento específico de proteínas, lípidos y ligandos inorgánicos (Zelensky y Gready, 2005). En insectos tienen un papel similar y se ha visto implicada en la estimulación de los hemocitos para activación de la fenol oxidasa (PO) y el proceso de nodulación (Yu y Kanost, 2004).

2.1.1.2 Proteínas de reconocimiento de peptidoglicano

El peptidoglicano consiste en un copolímero formado por una secuencia rica en N-acetil-glucosamina y ácido N-acetilmurámico, y se encuentra principalmente en la superficie de las bacterias Gram positivas (Tsakas y Marmaras, 2010). Las proteínas reconocedoras de peptidoglicano (PGRP) se encuentran en insectos, moluscos, equinodermos y vertebrados. Pueden ser de dos tipos: PGRPs de cadena corta, sintetizados en la hemolinfa, cutícula y cuerpo graso, o PGRPs de cadena larga, sintetizados en los hemocitos (Marmaras y Lampropoulou, 2009). El reconocimiento de PAMP de bacterias Gram negativas o positivas por los PGRP, activa las vías de señalización *Toll* o IMD (vías de inmunodeficiencia) llevando la translocación de la proteína NF- κ B/Rel, proteínas relacionadas con la familia Rel de NF- κ B, que activa la expresión de PAMs (Tsakas y Marmaras, 2010).

2.1.1.3 Proteínas reconocedoras de β 1,3-glucano

Las proteínas reconocedoras de β 1,3-glucano (β GRPs) son PAMs que se encuentran de forma soluble en la hemolinfa o anclada a la membrana celular por un glicosil-fosfatidil-inositol. Tiene la función de reconocer LPS de bacterias Gram

negativas y β -1,3-glucanos en hongos, además de unirse a la proteínasa-14 precursora, a través de interacciones proteínicas específicas que activan el sistema proPO (Marmaras y Lampropoulou, 2009; Tsakas y Marmaras, 2010).

2.1.1.4 Integrinas

Las integrinas son proteínas diméricas transmembranales, que consisten en una subunidad α y β . En los insectos se codifican diferentes subunidades α y β como β PS y α PS4 de *Drosophila*, las cuales están muy relacionadas con las subunidades en lepidópteros e insectos (Schmidt, 2008). Las integrina son las principales moléculas de reconocimiento de agentes externos, así como de la iniciación de la respuesta inmune. Ambos participan en la encapsulación y fagocitosis estimulando la adhesión de los hemocitos (Tsakas y Marmaras, 2010).

2.1.1.5 Hemolina

La hemolina es un miembro de la súper familia de las inmunoglobinas y se encuentra libre en la hemolinfa, es sintetizada por el cuerpo graso del insecto. Se ha reportado en varias especies de lepidópteros como *Hyalophora cecropia* (Linnaeus), *Manduca sexta* (Linnaeus), (Tsakas y Marmaras, 2010) y *Plodia interpunctella* (Hübner) (Aye *et al.*, 2004). Aunque no presenta una actividad antimicrobiana directa, la hemolinfa se une a los hemocitos y bacterias invasoras para funcionar como una proteína de respuesta inmune. En *M. sexta* reconoce y se une en el mismo sitio al LPS y al ácido lipoteicoico de Gram positivas (Tsakas y Marmaras, 2010). En general, la *hemolina* es sobre-expresada cuando los lepidópteros se infectan con bacterias (Terenius *et al.*, 2009). Sin embargo, en *P. interpunctella* sólo se encontró *hemolina* cuando larvas fueron expuestas a una infección bacteriana (detectada en el quinto estadio larvario) o en pupas sanas (Aye *et al.*, 2004).

2.1.2 Respuesta Humoral

Los componentes humorales de la respuesta inmune en insectos incluyen a la fenol oxidasa (PO), que es responsable de melanización de organismos extraños, la cicatrización de heridas y la producción de enzimas bacteriolíticas o péptidos antimicrobianos (PAMs) (Hartzer, *et al.*, 2005; Ericsson *et al.*, 2009). Sin embargo, esta última no se detecta en el insecto sino hasta después de 6 a 12 horas de iniciar la infección.

2.1.2.1 Péptidos Antimicrobianos

El reconocimiento de patógenos invasores como bacterias, hongos e inclusive virus, provoca la síntesis de PAMs y su secreción en la hemolinfa (Tsakas y Marmaras, 2010). Estos péptidos se sintetizan principalmente en el cuerpo graso, y en menor medida, en los hemocitos, integumento, intestino, glándulas salivales y estructuras reproductivas, mediante la vía de señalización de IMD y NF- κ B (Vallet-Gely *et al.*, 2008)

Los PAMs son moléculas pequeñas de 12-50 residuos de aminoácidos; estos péptidos catiónicos se unen a las membranas aniónicas de bacterias y hongos provocando la alteración de la membrana y la muerte celular (Bulet y Stöcklin, 2005). Tienen diferentes estructuras y organismos blanco y se clasifican en cuatro grupos: cecropinas, péptidos ricos en cisteína, péptidos ricos en prolina y péptidos ricos en glicina (Tsakas y Marmaras, 2010).

2.1.2.2 Fenol oxidasa

La melanización y la ruta que lleva a la formación de la melanina, es aprovechada contra un gran rango de patógenos. En dípteros y lepidópteros participa

junto con los hemocitos en la formación de nódulos y cápsulas (Sideri *et al.*, 2008). Este proceso requiere como precursor a la tirosina, que es convertida a dihidroxi-fenilalanina (Dopa) por una tirosina hidroxilasa. Posteriormente, la Dopa puede ser descarboxilada, por una Dopa-descarboxilasa a dopamina; o ser oxidada por una fenol oxidasa (PO) a dopaquinona (Tsakas y Marmaras, 2010; Sideri *et al.*, 2008). Este proceso es mediado por una cascada de serinas que activa la profenol oxidasa (proPO) a PO, bajo la estimulación de peptidoglicano, β -glucanos o lipopolisacárido (Valadez-Lira *et al.*, 2012).

Diferentes tipos de respuestas inmunitarias se correlacionan con la inducción de la actividad de lisozimas y PAMs, usualmente en infecciones bacterianas, y la actividad de la PO se ha asociado a infecciones fúngicas e invasiones de organismos multicelulares (Freitak *et al.*, 2007).

Según Ericsson *et al.*, (2009), la actividad de la PO es ampliamente usada como indicador de inmunocompetencia en insectos. Esta característica también es aprovechada por los insectos parasitoides, evitando parasitar insectos que tienen mayor capacidad de producir PO, lo cual puede ayudar a predecir parámetros de parasitismo en posibles insectos blanco (Smilanich *et al.*, 2009).

2.1.3 Respuesta celular

La respuesta celular es llevada a cabo por los hemocitos, los cuales son responsables de varios tipos de respuesta inmunológica en los insectos. La reacción de los hemocitos ante la invasión de microorganismos es inmediata después de que la infección ha sido registrada (Stanley y Miller, 2006). Los hemocitos son los responsables de la fagocitosis, y en conjunto con la PO, de la nodulación y encapsulación (Sideri *et al.*, 2008).

Lepidópteros como *Pseudoplusia includens* (W.), *Manduca sexta* (L.), y *Bombyx mori* (L.), tienen cuatro diferentes tipos de hemocitos: los granulocitos (responsables de la fagocitosis), los oenocitos (quienes producen PO), las células esfera y los plasmacitos (responsables de la encapsulación). Los hemocitos son producidos en los órganos hematopoyéticos donde se producen los pro-hemocitos, que posteriormente se transformarán en los diferentes tipos de hemocitos (Strand, 2008).

2.1.3.1 Fagocitosis

La fagocitosis es inducida cuando los receptores en las superficies de los fagocitos son activadas por las células blanco. Esta respuesta puede ser activada por diferentes tipos de bacterias. Las células responsables de este proceso son los granulocitos y los plasmacitos, que se encuentran circulando por la hemolinfa (Tsakas y Marmaras, 2010). Recientes estudios reportan que en *M. sexta*, los fagocitos tienen diferentes funciones, en donde los plasmacitos fagocitan perlas microscópicas inyectadas en la hemolinfa (agentes externos); mientras que los granulocitos, están involucrados en fagocitar células propias muertas (Ling y Yu, 2005).

2.1.3.2 Nodulación

La nodulación se refiere a los agregados de hemocitos que atrapan a un gran número de bacterias, que pueden o no ser melanizados, dependiendo del número de invasores (Tsakas y Marmaras, 2010). El primer paso para la nodulación es la formación de microagregados de 10 a 20 hemocitos; estas micro-agregaciones siguen creciendo hasta generar las nodulaciones, que son completadas con una capa final de hemocitos, quienes producen una reacción de melanización, creando nódulos oscuros (Stanley y Miller, 2006).

2.1.3.3 Encapsulación

La encapsulación es la unión de los hemocitos a organismos invasores de gran tamaño como parásitos, nematodos y protozoarios. En este caso, los hemocitos se unen al invasor, rodeándolos mediante una cápsula que puede ser melanizada. Dentro de la cápsula, el parásito muere por la producción de radicales libres, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno o por asfixia (Marmaras y Lampropoulou, 2009).

2.2. *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Bt es una bacteria Gram-positiva, que se caracteriza por su habilidad para producir inclusiones cristalinas durante la esporulación que pueden ser tóxicas a ciertos insectos y otros organismos. Estas inclusiones, consisten en proteínas que tienen una gran actividad insecticida específica (Höfte y Whiteley, 1989; Peyronnet *et al.*, 1997). Los genes *cry* son expresados en la fase estacionaria y se acumulan en la célula madre en forma de inclusiones cristalinas que pueden representar de 20-30% del peso seco en células esporuladas (Schnepf *et al.*, 1998). Estas inclusiones cristalinas se disuelven y digieren en el intestino medio por efecto del pH alcalino y enzimas específicas de larvas, liberando una o más proteínas cristalinas llamadas proteínas Cry, que son la forma activa de la toxina (Ferré and Van Rie, 2002).

Además de las toxinas Cry, proteasas, quitinasas, proteínas vegetativas insecticidas (VIPs, por sus siglas en inglés) y compuestos anti-fúngicos contribuyen a la virulencia de Bt a organismos susceptibles, principalmente insectos (Schnepf *et al.*, 1998).

Formulaciones con Bt como agente activo, pueden proporcionar una valiosa alternativa a los insecticidas sintéticos, que tienen como desventajas los daños ambientales y riesgos para la salud (Cerón, 2001; Sanahuja *et al.*, 2011).

De igual manera, las plantas modificadas genéticamente para expresar toxinas Cry de Bt, proveen un método alternativo y altamente efectivo de control biológico. Hoy en día se cultivan plantas transgénicas de papa, algodón y maíz que expresan toxinas de Bt en Estados Unidos; y uno o más de estos productos son comercializados en Argentina, Australia, Canadá, China, Francia, México, Portugal, Rumania, Sudáfrica, España y Ucrania, entre otros (Betz *et al.*, 2000; Sanahuja *et al.*, 2011). Tan sólo en el 2001, se sembraron 14 millones de hectáreas de cultivos que expresan toxinas Cry en todo el mundo (Griffitts y Aroian, 2005); y para el 2008, se sembraron 50 millones de hectáreas de maíz (Sanahuja *et al.*, 2011).

2.2.1 Toxinas Cry

La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1998).

La familia de proteínas Cry proporciona una rica diversidad de variantes de la toxina con diferentes espectros de actividad. Teniendo en cuenta estas propiedades, cepas de Bt seleccionadas, y algunas modificadas genéticamente (principalmente de maíz y algodón) que expresan una o más toxinas Cry, se producen a gran escala para combatir las plagas de insectos, así como insectos vectores de enfermedades (Cerón, 2001).

2.2.2 Modo de Acción de toxinas Cry

El modo de acción de las proteínas Cry implica varios pasos (Figura 2): después de la ingestión por los insectos susceptibles, los cristales se solubilizan y se liberan las protoxinas. Estas protoxinas son procesadas por proteasas del intestino medio, la toxina

producto de la proteólisis (forma activa), pasa a través de la membrana peritrófica y se une a un determinado receptor que se encuentra en las células del borde de la membrana ciliada del intestino medio. Esto va seguido por la inserción parcial de la toxina en la membrana, que conlleva a la formación de poros, la lisis celular, y eventualmente, la muerte del insecto (Schnepf *et al.*, 1998; Peyronnet *et al.*, 1997). Las toxinas Cry1A, es el mayor grupo de δ -endotoxinas y son activas contra una gran variedad de larvas de lepidópteros (Yu-Cheng *et al.*, 2000).

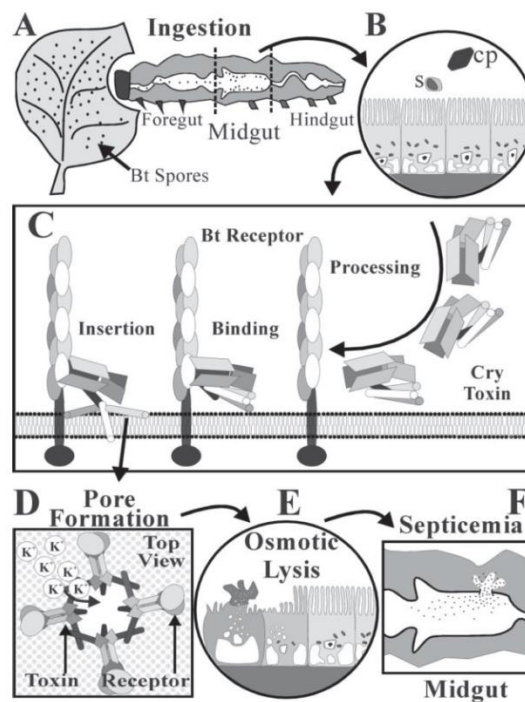


Figura 2. Mecanismo general del modo de acción de las toxinas Cry de Bt (Whalon y Wingerd, 2003).

2.2.3 Respuesta inmune de insectos expuestos a Bt

En lepidópteros, se ha observado que la respuesta inmune a Bt puede ser de tipo humoral o celular, a dosis bajas de Bt. En larvas de *G. mellonella*, se mostró que se elevan los niveles de estrés oxidativo en el intestino, así como la actividad de fagocitosis de los hemocitos (Dubovskiy *et al.*, 2008). En larvas de *Trichoplusia ni* (H.) expuestas a Bt, se ha observado que se reduce el número de hemocitos y varían los componentes humorales, como PAMs y la actividad de PO (Tamez-Guerra *et al.*, 2008; Broderick *et al.*, 2010; Ericsson *et al.*, 2009). Principalmente, se ha reportado que los niveles de PO se redujeron después de ser expuestas a dosis bajas de Bt. Sin embargo, Valadez-Lira *et al.*, (2012) encontraron resultados contrarios, donde la actividad de la PO aumentó significativamente después de la exposición a una concentración letal media (CL₅₀) en larvas del 4to estadio de *Heliothis virescens* (F.) y del 2do estadio de *P. interpunctella*.

2.2.4 Resistencia de insectos a toxinas Cry

A pesar de la efectividad, ser amigable al ambiente y el bajo desarrollo de resistencia a productos de Bt, *P. interpunctella* fue el primer insecto reportado en adquirir resistencia a toxinas de Bt, mediante la exposición continua a un producto comercial a base de Bt en laboratorio durante 15 generaciones (McGaughey, 1985; McGaughey & Johnson, 1992).

Los mecanismos de resistencia de los insectos a Bt se han relacionado a cada uno de los pasos del modo de acción de las proteínas Cry, que son: solubilización, procesamiento proteolítico, el paso a través de la membrana periotrófica, la unión al receptor, la inserción de la membrana, la formación de poros y la lisis osmótica de las células del intestino medio (Oppert *et al.*, 1997; Tamez-Guerra, 2010). No obstante, se han observado distintos mecanismos de desarrollo de resistencia en las colonias resistentes de *P. interpunctella* bajo condiciones de laboratorio (Ferré & Van Rie, 2002;

Candas *et al.*, 2003). En muchos insectos la toxicidad de las endotoxinas de Bt se ha correlacionado con la unión a los receptores específicos de la membrana del intestino medio, incluyendo los receptores cadherina, aminopeptidasas y anclas glicosil-fosfatidilinositol, como la fosfatasa alcalina (Broderick *et al.*, 2009). La interacción de estos receptores con toxinas de Bt es determinante para la especificidad de la toxina (Yu-Cheng *et al.*, 2000). La principal proteína de unión a toxinas Cry1A en muchas especies es la aminopeptidasa.

2.3 Comunidad microbiana intestinal en insectos

Los microorganismos juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de muchas especies de insectos. Los endosimbiontes, contribuyen a la reproducción, digestión, nutrición y la producción de feromonas. La alta alcalinidad (pH de 8 a 10) en el intestino, son atributos reconocidos entre las larvas de lepidópteros y sus bacterias (Broderick *et al.*, 2004). Inclusive, se ha reportado un pH por encima de 12.5 en el intestino de la mayoría de los lepidópteros (Allen *et al.*, 2009), así como su variación química, generada por el rango excepcionalmente amplio de alimentación de algunas especies, lo que hace de este entorno un desafío para los microorganismos (Broderick *et al.*, 2004). Debido a esto, la microbiota del intestino de insectos se encuentra bajo una fuerte presión selectiva (Allen *et al.*, 2009).

Las comunidades microbianas suelen experimentar modificaciones en la composición y estructura, esto puede deberse a cambios en la disponibilidad de nutrientes, aspectos medioambientales y la proximidad a otros organismos (Robinson *et al.*, 2010).

Las aportaciones beneficiosas de la microbiota intestinal a la salud del huésped son generalmente conocidos. Desafortunadamente también puede generar efectos negativos, como perturbaciones en la composición o ubicación de la microbiota

intestinal, que puede llevar a estados patológicos y mortalidad del huésped (Broderick *et al.*, 2009). De igual manera, estas comunidades bacterianas pueden afectar la virulencia de microorganismos entomopatógenos. Tal es el caso de la cepa BGI-1 aislada de la cucaracha germana (*Blattella germanica*, L.) e identificada como *Bacillus subtilis* en base a su secuencia 16S del ARNr. Esta bacteria produce una inhibición del crecimiento y esporulación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, así como una disminución en la infección en *B. germánica* (Huang *et al.*, 2013).

Broderick *et al.* (2006), demostraron que la eliminación de las bacterias entéricas del intestino de larvas de *Lymantria dispar* (L.) mediante antibióticos (gentamicina, estreptomicina, penicilina y rinfampicina) reduce la susceptibilidad a formulaciones de Bt compuesta de células, esporas y toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, y Cry2A. En el 2009, el mismo equipo encontró un resultado similar en otras 5 especies: *Vanessa cardui* (L.), *M. sexta*, *Pieris rapae* (L.) y *H. virescens*; ellos demostraron que en algunas especies de larvas, las bacterias del intestino contribuyen a la susceptibilidad de Bt. Por otra parte, sugieren que las perturbaciones causadas por la alimentación de la toxina inducen a las bacterias benignas del intestino a ejercer efectos patógenos, por lo cual las interacciones entre Bt y la microbiota intestinal de los lepidópteros pueden generar nuevos modelos para identificar los factores de susceptibilidad y resistencia a Bt. Sin embargo, Johnston y Crickmore en el 2009, demostraron que en *M. sexta*, que éste fenómeno es generado por los antibióticos, y no por la ausencia de microbiota, manteniendo insectos de manera aséptica desde huevecillo y comparando con los tratados con antibióticos rinfampicina-estreptomicina. Posteriormente, Frankenhuyzen *et al.*, en el 2010, probaron la influencia de varios antibióticos (Aureomicina, Ampicilina y coctel de Broderick *et al.*, (2006) en la susceptibilidad de *Choristoneura fumiferana* (Clem) y *L. dispar* a Bt. Ellos reportaron que estos antibióticos podían influenciar de forma diferente a la susceptibilidad a Bt.

2.4 Ficha técnica de *Plodia Interpunctella* (Hübner)

P. interpunctella, comúnmente conocida como la palomilla india de la harina, es un insecto plaga cosmopolita de productos almacenados, como granos y cereales (Arbogast y Chini, 2005; Johnson *et al.*, 2003; Mohandassa *et al.*, 2007) y productos alimenticios procesados, tal como de alimento para mascotas, mezclas para hornear, cereales para el desayuno, y dulces hechos con nueces y chocolate (Mbata y Shapiro-Ilan, 2005; Nansen y Phillips, 2004). Por tal razón es considerada la principal plaga de alimentos almacenados de importancia económica a nivel mundial (Mohandassa *et al.*, 2007), En México las pérdidas por infestaciones de *P. interpunctella* tan sólo del ajo almacenado representan más del 30% del importe total (Perez-Mendoza y Aguilera-Peña, 2004)

En su estado adulto, es una palomilla con una expansión alar de aproximadamente 1.9 cm, (García-Lara *et al.*, 2007). La hembra pone de 60 a 300 huevos, aislados o en grupos, en los granos almacenados que le servirán de alimento. Las larvas del último estadio son muy activas, por lo que salen del interior de un grano para desplazarse a otro, e incluso ascienden por las paredes del contenedor. Una vez que las larvas completaron su desarrollo, forman las pupas (capullos blancos y sedosos) en la parte exterior de la masa del grano (García-Lara *et al.*, 2007). Tanto las fases larvarias como de adulto se alimentan de granos, con las consecuencias antes mencionadas (Figura 3).

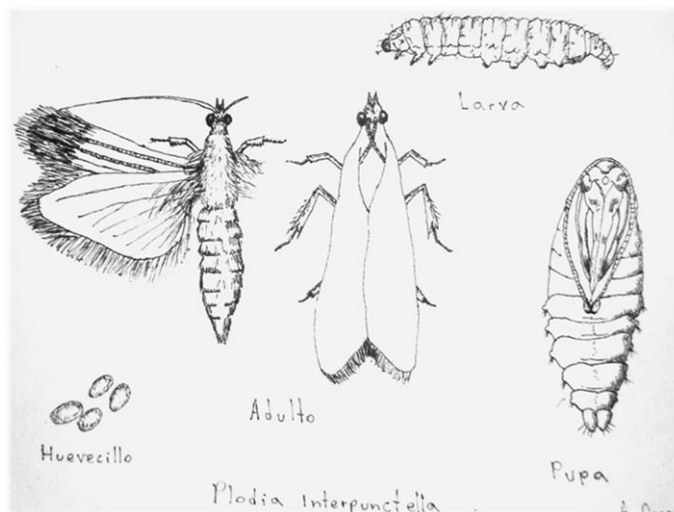


Figura 3. Diferentes estados del ciclo de vida de *Plodia interpunctella*

La habilidad de *P. interpunctella* para desarrollar resistencia a las tácticas de control, como el empleo de insecticidas químicos y productos comerciales de *B. thuringiensis*, hace de éste lepidóptero, una especie clave para el entendimiento del desarrollo de resistencia (Mohandassa *et al.*, 2007; McGaughey, 1985; Yu-Cheng *et al.*, 2000). Con todo lo anterior descrito, el presente trabajo se enfocó a la evaluación de la relación entre la comunidad microbiana y la susceptibilidad a Bt, en poblaciones o cepas de insectos que muestren resistencia al bioinsecticida.

3. HIPÓTESIS

La reducción de la microbiota intestinal de *P. interpunctella* mediante la administración de antibióticos, disminuye la respuesta inmune basal del insecto lo que incrementa su susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la microbiota intestinal de *P. interpunctella* sobre la respuesta inmune y la susceptibilidad del insecto a Bt.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar la actividad insecticida (porcentaje de mortalidad) de un producto a base esporas y cristales de Bt (Bactoespeine) contra larvas de *P. interpunctella*.
- b) Evaluar el efecto de la eliminación de la microbiota intestinal de *P. interpunctella* mediante antibióticos, sobre su respuesta inmune y su susceptibilidad Bt.
- c) Detectar e identificar las bacterias presentes en la microbiota del intestino de *P. interpunctella* mediante secuenciación del gen 16S del ARNr.

5. Metodología

En los diferentes bioensayos, en los reactivos que no se indica otra casa comercial, estos se adquirieron en Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V. (Toluca, Estado de México, MX).

5.1 Insectos

Para el estudio se utilizó una cría de *P. interpunctella* obtenida de la colección de insectos de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación de Granos Almacenados del USDA-ARS, Maniatan, KS. La cría masiva de insectos es mantenida con dieta a base de trigo molido, fibra de trigo, germen de trigo, levadura, miel, glicerina y agua (McGaughey y Beeman, 1988).

5.2 Evaluación de la susceptibilidad de *Plodia interpunctella* al insecticida Bactospeine® DF

La susceptibilidad de larvas de *P. interpunctella* a Bt se evaluó mediante un bioensayo dosis-respuesta, usando el producto comercial Bactospeine® DF (Valent Biosciences de México, S.A. de C.V.), el cual tiene como base a un *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, el cual contiene células bacterianas, toxinas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A), y esporas, con una potencia de 32,000 unidades internacionales (UI) por miligramo. Para lograrlo se emplearon cajas Petri de poliestireno de tapa ajustada de 50 X 9 mm (tight lid, BD-Falcon™, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) y se evaluaron a dosis de 0, 3, 30, 100, 500, 1000 y 3200 UI/cm² de dieta artificial (Tamez-Guerra *et al.*, 2006), utilizando 30 larvas de segundo-tercer instar por cada concentración. La mortalidad se evaluó a los 5 días después de la exposición a la dieta

con las diferentes concentraciones. Con los datos de larvas vivas y muertas se estimó la CL₅₀ por medio de un análisis Probit (Bliss, 1934), usando el paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* versión 17.0 (SPSS, 2008).

5.3 Erradicación de microbiota intestinal de *P. interpunctella*

Debido a que se ha demostrado que la susceptibilidad de larvas de lepidopteros a Bt puede variar en base a la carga bacteriana del intestino, para poder evaluar el impacto que tendría en el insecto a investigar (*P. interpunctella*), procedimos a la erradicación de su microbiota intestinal, para lo cual se emplearon dos metodologías: el uso de antibióticos y la desinfección con cloro de huevecillos.

5.3.1 Erradicación de Microbiota intestinal mediante antibióticos

Primeramente se probó la metodología de erradicación de microbiota propuesta por Broderick *et al.*, (2006-2010) que consiste en una mezcla de gentamicina, estreptomicina, penicilina y rinfampicina a concentraciones de 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mg de dieta artificial similar a la descrita anteriormente. Se expusieron 30 larvas del 2do estadio por concentración de la mezcla de antibióticos. Los parámetros a evaluar fueron: presencia/ausencia de bacterias por PCR, además de sobrevivencia o mortalidad de las larvas expuestas.

5.3.2 Preparación de huevecillos de *P. interpunctella* libres de bacterias

Utilizando un pincel, se colocó un volumen aproximado de 100 µL de huevecillos en un microtubo de 1.5 mL, se agregaron 1.0 mL de solución salina al 0.8 %, posteriormente se agitó por inversión y se esperó a que los huevecillos se precipitaran, manteniendo los desechos flotando; posteriormente, se tomaron los huevecillos con una

micropipeta con puntillas a las que previamente se les cortó la punta, para evitar taponamientos, y se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 13% (Cloralex™, Industrial Alen, Santa Catarina, N.L., MX) diluído al 5% durante 15 seg. Al precipitarse los huevecillos, éstos se tomaron nuevamente con la micropipeta para hacerles tres lavados continuos en solución salina al 0.8 %. Al final, los huevecillos se colocaron con la micropipeta en dieta estéril a base de granos dentro de cajas de petri de poliestireno previamente descritas (50 x 9 mm).

5.3.3 Detección de presencia/ausencia de microbiota de larvas tratadas con antibióticos y desinfección con cloro.

La detección de la presencia de bacterias intestinales se realizó mediante la amplificación de genes del ARNr 16S, utilizando los oligonucleótidos 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1492R 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3' referidos por Frank *et al.*, (2008). Para lograrlo, se extrajo ADN bacteriano, a partir de intestinos de las larvas sometidas a antibióticos, por medio del protocolo de extracción fenol-cloroformo de ácidos nucleicos (Sambrook y Russell, 2001). La reacción se realizó con GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 1X, 15-30 ng de ADN extraído, y 1 µM de cada oligonucleótido, y se aforó a 20 µL por reacción, las cuales, se corrieron a una temperatura de desnaturalización inicial 94°C por 10 min; 30 ciclos de 94°C por 40 seg, alineamiento a 60°C por 40 s y 72°C por 2 min; con una temperatura de elongación final de 72°C durante 5 min.

5.4 Análisis de la respuesta inmune de *P. interpunctella*

Los factores de respuesta inmune que se analizaron en diferentes experimentos en este trabajo fueron: detección de transcritos de *hemolina*, actividad fenol oxidasa y número de hemocitos por mililitro.

5.4.1 Estandarización para el análisis de respuesta inmune en *P. interpunctella*.

5.4.1.1 Evaluación de transcritos del gen *hemolina*

Para la evaluación de transcritos del gen *hemolina* inicialmente se realizó la extracción de ARN a partir de larvas de *P. interpunctella* de los diferentes tratamientos. Para lograrlo, se homogenizaron de 5 a 8 larvas del tercer estadio, en 1.0 mL de Tri-Reagent (Ambion, Inc, Austin, TX, USA). Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, y se añadieron 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de Tri-Reagent utilizado. Se agitó con ayuda de un Vortex durante 15 seg, y se incubó de 2 a 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min.

Para la obtención del ARN se recuperó la fase incolora superior de la muestra y se transfirió a otro tubo Eppendorf con un volumen igual de isopropanol frío. Se mezcló por inversión e incubó a -20°C durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min y se procedió a eliminar el sobrenadante y lavar la pastilla de ARN con un mililitro de etanol al 75% en agua con 0.1% de dietilpirocarbonato por litro (agua DEPC). Se centrifugó la pastilla durante cinco min a 10,000 rpm. Por último, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 50 µL de agua DEPC para finalmente incubar a 65°C durante 10 min. El ARN obtenido se cuantificó en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Palm Beach, FL, USA) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

A partir del ARN extraído, se sintetizó la hebra de ADNc (ADN complementario) mediante el kit Improm-RT (Promega), para lo cual se adicionaron 10 µg de ARN obtenido a un tubo Eppendorf en un volumen de reacción de 50 µL, el cual contiene buffer de reacción 5X (10 µL) (250 mM Tris-HCl a pH 8.3, 375 mM KCl, 50 mM dithiothreitol), 4 µL de 25 mM MgCl₂, 1 µL de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin), 2 µL de dNTPs, 1 µL de oligo dT12-18 y 1 µL de unidades de transcriptasa reversa (RT) del virus de la leucemia Moloney Murina (MMLV), y se ajustó a un volumen de 50 µL

con agua DEPC. La mezcla se incubó a 42°C durante 120 min para la reacción y finalmente se inactiva la enzima a 60°C durante 10 min.

Posteriormente, para estandarizar la amplificación del gen constitutivo de la proteína ribosomal S7 se utilizaron los oligos 1RPS75 (5' ACA ACA AGA AGT CAA TCA TCA TCT A 3') y 2RPS73 (5' TTGTGCTCAATGGTGGTCTGTTG 3'), que sirven como control interno de expresión. Este experimento se desarrolló con ARN de larvas completas de *P. interpunctella* que no estuvieron en contacto con ningún tipo de insecticida (control negativo).

Para el análisis de expresión por RT-PCR de los transcritos que codifican para el péptido antimicrobiano hemolina, se diseñaron oligonucleótidos específicos: PiHemF 5'-AAA TTG GAG TGC CAG CAG TT-3' y 5'-GGG GAG TTC CCC CAT AAA TA -3' en base a la secuencia reportada en *Genbank* AY771598. Se amplificó por reacción PCR en un volumen de 20 µL, en presencia de 5 µL de templado (DNAC), 1X de *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega), y 1 µM de cada oligonucleótido. Las reacciones se corrieron a una temperatura de desnaturalización inicial 94°C por 10 min; 25 ciclos de 94°C por 40 seg, gradiente alineamiento (estandarización) de 43-52°C por 40 seg y 72°C por 1 min; con una temperatura de elongación final de 72°C durante 5 min.

Las bandas amplificadas se compararon de manera semi-cuantitativa por densitometría para su análisis de expresión mediante el software ImageJ 1.46. Dicho análisis fue semi-cuantitativo, partiendo de 1 µg de ARN.

5.4.1.2 Análisis de la actividad fenol oxidasa

Para determinar la actividad fenol oxidasa, las larvas de *P. interpunctella* se enfriaron a -20°C durante 5 min y se lavaron con solución de hipoclorito de sodio al 13% (Cloralex™) diluida al 2.5%. La hemolinfa se colectó mediante centrifugación y recuperación del sobrenadante, posteriormente se depositó en microtubos. Para medir la

actividad PO, se pasaron 5 μ L de hemolinfa a placas de 96 pozos con 195 μ L de L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) a 100mM en buffer de fosfato salino o por sus siglas en inglés PBS (NaCl a 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2mM, a un pH de 7.4 ajustado con HCl). La actividad PO se determinó midiendo la absorbancia en un lector multicanal DTX 880 Multimode Detector® (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA) a una densidad óptica de 570 nm a intervalos de 15 min durante una hora, basado en la metodología descrita por Valadez-Lira *et al.* (2012).

5.4.1.3 Conteo de hemocitos

La hemolinfa se colectó mediante un corte en el tercer segmento del insecto, la gota de hemolinfa de 3 insectos fue depositada en una superficie plana (porta objetos). Posteriormente, se colectó con ayuda de una micropipeta y se diluyó 1:10 con PBS, y fue cuantificada en la Cámara de Neubauer.

5.4.1 Evaluación de la Respuesta Inmune basal de *Plodia interpunctella*.

Para determinar la respuesta inmune basal de *P. interpunctella*, se seleccionaron 20 ejemplares al azar de cada estadio larvario, prepupas, pupas y adultos, de los cuales se utilizaron 5 para la extracción de ARN, y los restantes para la extracción de hemolinfa, con el fin de medir la actividad PO por triplicado.

5.4.2 Efecto de diferentes antibióticos en la respuesta inmune de *P. interpunctella*

Para ver el efecto en los estados basales de la respuesta inmune de *P. interpunctella*, al ser expuesta a dosis de antibióticos no inhibitoras de microbioma intestinal, se expusieron un total de 30 larvas por cada antibiótico (gentamicina,

estreptomicina, penicilina, rinfampicina y ampicilina), a una concentración de 50 µg/mL de dieta artificial.

5.4.3 Respuesta inmune de larvas mantenidas en condiciones estériles desde huevecillo.

Bajo condiciones de esterilidad y en frío se tomaron las larvas mantenidas en condiciones estériles desde huevecillo y se les extrajo hemolinfa suficiente para el conteo de hemocitos. Los cuerpos de las larvas se almacenaron en *Tri-Reagent* para la extracción de ARN y RT-PCR semi-cuantitativa de transcritos de *hemolina* y *S7* como gen constitutivo.

5.5 Susceptibilidad de *P. interpunctella* a Bt bajo diferentes estados de microbiota intestinal.

5.5.1 Comparación de la susceptibilidad a Bt de *P. interpunctella* tratada con antibióticos.

En base a la CL_{50} estimada, se comparó la susceptibilidad de *P. interpunctella* al producto Bactospeine® DF, bajo distintas cargas de flora microbiana. Para lograrlo se usaron los siguientes tratamientos como variables independientes: CL_{50} de Bactospeine® en dieta artificial para *P. interpunctella* (tratamiento 1), CL_{50} de Biobit en larvas tratadas con antibiótico (tratamiento 2), CL_{50} de Bactospeine® en larvas tratadas con antibiótico y mantenidas bajo condiciones de esterilidad (tratamiento 3), y a manera de control negativo, las condiciones antes mencionadas pero sin la adición de Bactospeine® DF (tratamiento 4). Como variables dependientes se evaluó el porcentaje de mortalidad y algunos indicadores de la respuesta inmune como: RT-PCR semi-

cuantitativa del péptido antimicrobiano hemolina, el número de hemocitos y actividad de PO.

5.5.2 Comparación de la susceptibilidad a Bt de *P. interpunctella* desinfectadas desde huevecillos y mantenidas en condiciones de esterilidad.

Para evaluar la diferencia en la susceptibilidad a Bt entre larvas asépticas sin el uso de antibióticos y larvas en condiciones normales, en condiciones de esterilidad usando campana de flujo laminar y dieta estéril se realizó un bioensayo comparativo, con un total de 30 larvas por tres repeticiones por tratamiento, los cuales consistieron en larvas mantenidas estériles y expuestas a la CL₅₀ del producto en base a Bt (tratamiento 1), y larvas normales expuestas a la CL₅₀ de Bt (tratamiento 2), larvas asépticas expuestas sin exposición a Bt (control). Los datos de larvas vivas y muertas se registró a los 5 días de iniciar el bioensayo.

5.6 Identificación de la microbiota del intestino de *P. interpunctella* mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

5.6.1 Amplificación por PCR del gen 16S ARNr de comunidades bacterianas del intestino de *P. interpunctella*

5.6.1.1 Preparación de muestra de intestinos de larvas

Trabajando en condiciones de esterilidad se obtuvieron los intestinos de larvas de 4-5 estadio, a las cuales se les realizó un lavado externo con solución de hipoclorito de sodio al 13% (Cloralex™) diluida al 2.5% durante 10 seg, posteriormente se enjuagaron con agua estéril. Utilizando pinzas de disección se separaron los intestinos al estirar la parte anal del insecto y la cabeza. Los intestinos se sumergieron en PBS y se agitaron en

vortex para resuspender las bacterias presentes. La extracción de ADN se realizó mediante el Kit *AxyPrepTM Multisource Genomic DNA Miniprep Kit* (Axygen Biosciences, Union City, CA).

5.6.1.2 Amplificación por PCR del gen ARNr 16S

Para la Amplificación por PCR de genes 16S del ARNr se utilizaron los oligonucleótidos 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1492R 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3' reportados por Frank *et al.* (2008). La reacción se realizó con *Taq & GoTM Master Mix* (Promega) 1X de MP, 100 ng de ADN; y 2 μ M de cada oligonucleótido, se aforó a 50 μ L por reacción con agua DEPC, las cuales se corrieron a una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 10 min; 35 ciclos de 94°C por 40 seg, alineamiento a 60°C por 40 seg y 72°C por 2 min; con una temperatura de elongación final de 72°C durante 5 min.

5.6.2 Clonación y secuenciación del producto de PCR.

5.6.2.1 Purificación de producto de PCR del gen del ARNr 16S a partir de gel de agarosa.

El producto se separó mediante una electroforesis en agarosa al 1% a 100 V durante una hora. Para evitar el daño por la luz UV, la banda a purificar se mantuvo cubierta con papel aluminio. En base a las bandas no cubiertas se cortó la banda del tamaño estimado y se pasó a un microtubo de 1.5 mL. Para ser purificada mediante el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

5.6.2.2 Ligación en vector pGEM-T Easy.

La banda purificada se insertó en el plásmido *pGEM-T Easy* (Promega) el cual tiene el gen *AMP^r* que le confiere resistencia a la ampicilina y el gen *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa y dentro del gen se encuentra el sitio de ligación (Figura 4), por lo cual la inserción de una secuencia deshabilita dicha expresión. Se empleó la *Ligase T4* (Promega) a una proporción molar 1:1 entre el inserto y el plásmido (23.33 ng de inserto de 1.4 kb y 50 ng de plásmido de 3 kb).

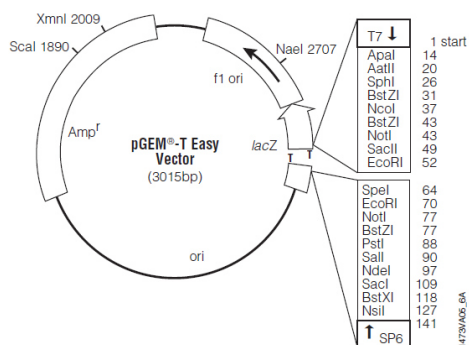


Figura 4. Mapa de plásmido pGEM[®]-T Easy con sus puntos de restricción

El plásmido también contiene múltiples sitios de restricción, incluyendo EcoRI a los extremos del sitio de ligación. (Figura 5), por lo la digestión mediante EcoRI libera el inserto del plásmido; así como secuencias de unión a *primers* para secuenciación pUC/M13, en la región reverse 176–197pb y forward entre 2949–2972 pb

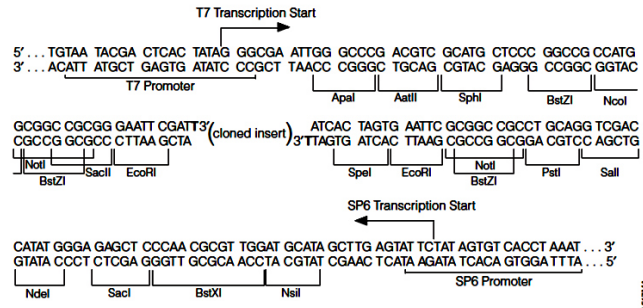


Figura 5. Promotor y secuencias de clonación múltiple, del vector pGEM[®]-T Easy

5.6.2.3 Transformación en *E. coli* TOP-10 calcio-competentes

En la clonación se utilizó la cepa *Escherichia coli* TOP-10 calcio competente preservadas en glicerol al 50% a -70°C. La transformación se realizó por choque térmico, empleando 200 µL de células competentes, las cuales se mantuvieron en hielo durante 20 min con 5 µL de plásmido ligado, seguido de un minuto y medio a 42°C y 10 min en hielo, posteriormente se agregó 1 mL de medio Miller, Luria Bertani (LB) (Difco[™], Becton Dickinson and Company) y se incubó con agitación 1 h a 37 °C.

Para la selección de las clonas con inserto se sembró por expansión en agar LB con 100µg/ml de ampicilina, para seleccionar las células con el plásmido, 0.5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor del gen *LacZ* y 80 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactosidasa (X-gal) como control de inserto para ser degradada por la β-galactosidasa y colorear en azul las colonias que carezcan del inserto.

Las colonias blancas que tienen el inserto se cultivaron en 4 mL de medio LB durante 12 h, posteriormente se extrajo el plásmido mediante el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega).

La verificación de la presencia del inserto en el plásmido se realizó mediante una digestión empleando la enzima EcoRI, lo cual libera el inserto del plásmido,

visualizándose bandas de 1.4 Kb y 3.0 Kb en las clonas que contienen el inserto. La restricción se llevó a cabo en reacciones de 20 μ L conteniendo 2 μ g de albumina suero bovino acetilado, 1x de buffer para restricción enzimática, 3 μ g de plásmido y 5 unidades de *EcoRI*.

Las digestiones se separaron mediante electroforesis en agarosa al 1% corridos a 100 V durante 1 h, se tiñeron en bromuro de etidio, y se visualizaron en luz ultravioleta.

5.6.2.4 Secuenciación

Los plásmidos purificados se enviaron al Laboratorio Nacional de Genómica para la diversidad para su secuenciación. Las muestras se mandaron en un volumen de 20 μ L a una concentración homogénea de 100 ng/ μ L en paca de 96 pocillos. La secuenciación se realizó por el método de Sanger de manera bidireccional utilizando los *primers* universales M13.

5.6.3 Análisis de secuencias

5.6.3.1 Edición de secuencias y búsqueda de secuencias de referencia.

Las secuencias *forward* y *reverse* fueron ensambladas y editadas para obtener una secuencia consenso y descartar errores, mediante el software *Geneious* version 4.8.5 (Biomatters Limited, Auckland, New Zealand). Las secuencias consenso fueron comparadas con las secuencias 16S ribosomal ARN de las bases de datos, utilizando *Basic local alignment search tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Las secuencias con mayor similitud se descargaron en formato FASTA para ser usadas como referencia en los análisis filogenéticos.

5.6.3.2 Clasificación taxonómica de las secuencias

La clasificación taxonómica, se realizó mediante las herramientas de la página <http://rdp.cme.msu.edu/> del *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2008). En ese sitio web se introdujo un archivo en formato FASTA con todas las secuencias de las clonas obtenidas para su análisis y clasificación. Para poder comparar la diversidad microbiana con lo publicado en otros artículos, se estimó el índice de Shannon-Weaver (Shannon, 1948) mediante la fórmula:

$$H = \sum_{i=1}^R p_i \ln(p_i)$$

5.6.4 Filogenia de microbiota intestinal comparada con las secuencias de referencia

5.6.4.1 Alineación y ajuste de secuencias.

Las secuencias consenso, obtenidas de las clonas con el inserto ARNr 16S fueron alineadas junto con las secuencias ARNr 16S de referencia. Mediante el software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), con algoritmos computacionales *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) (Edgar, 2004), los parámetros de alineamiento fueron de 8 interacciones; las interacciones 1 y 2 por el método de *Neighbor Joining* y las siguientes por el UPGMB. Posterior a la alineación, se homogenizaron los tamaños de todas las secuencias y se eliminaron los *gaps* para optimizar el análisis filogenético.

5.6.4.2 Análisis Filogenético.

El análisis filogenético a partir de la historia evolutiva de las secuencias de mayor tamaño (1400 pb) de las clonas ARNr 16S del intestino de *P. interpunctella* así como las secuencias de referencias, se realizó en el software libre MEGA 5 (Tamura *et*

al., 2011) mediante el método UPGMA (Sneath y Sokal,1973), con un total de réplicas de *test de bootstrap* de 100 (Felsenstein, 1985). Las distancias filogenéticas fueron computadas usando el método compuesto de Máxima Verosimilitud (Tamura y Kumar, 2004) en base al número de sustituciones por sitio, descartando todas las posiciones que tuvieran *gaps* y datos perdidos.

6. Resultados

6.1 Evaluación de la susceptibilidad de *P. interpunctella* al insecticida Bactospeine® DF.

Como parámetro de mortalidad de todos los bioensayos, se estimó la CL_{50} del producto comercial Bactospeine en *P. interpunctella*. La CL_{50} calculada fue de 541.4 UI por cada cm^2 superficial de dieta artificial fresca (Tamez-Guerra *et al.*, 2006) con un límite inferior de 432.65 UI/ cm^2 y superior de 692.35 UI/ cm^2 en cajas de Petri de 50 X 9 mm con un volumen de dieta de 6 mL como se muestra en la Figura 6.



Figura 6. Caja de Petri donde se realizaron los bioensayos de susceptibilidad a Bt

6.2 Detección de presencia/ausencia de microbiota intestinal de larvas tratadas con antibióticos.

6.2.1 Unidades formadoras de colonias.

Para confirmar la erradicación de la microbiota del intestino de *P. interpunctella*, mediante el empleo de antibióticos en la dieta, se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en los intestinos de larvas de tercer estadio. Las

suspecciones bacterianas de larvas tratadas a concentraciones de 250 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ del coctel de antibióticos no generaron UFC (Tabla 1).

Tabla 1. Carga bacteriana de intestinos de *Plodia interpunctella* tratada con distintas concentraciones de antibióticos en dieta artificial.

Dosis del coctel de antibióticos ($\mu\text{g/mL}$)	UFC/intestino
1000	0
500	0
250	0
100	3.0×10^2
50	1.25×10^4
0	7.38×10^7

6.2.2 Validación por PCR de gen ARNr 16S

Para asegurar la eficiencia de los antibióticos para eliminar la microbiota intestinal de *P. interpunctella*, se detectó la presencia de ADN bacteriano mediante PCR del gen ARNr 16S a partir de ADN de intestino de las larvas tratadas. Los resultados mostraron que a concentraciones mayores de 500 $\mu\text{g/mL}$ del coctel de antibióticos agregados a dieta artificial, no se detectó dicho gen, como se muestra en la Figura 7.

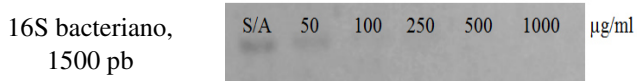


Figura 7. Detección por PCR de genes bacterianos del ARNr 16S en intestino de larvas del tercer estadio de *P. interpunctella* tratadas con diferentes concentraciones de antibióticos.

6.3 Evaluación de la respuesta inmune basal de *P. interpunctella*.

A manera de control se evaluaron diferentes indicadores de la respuesta inmune en las fases del ciclo de vida de *P. interpunctella*.

6.3.1 Actividad fenol oxidasa

Se detectó actividad PO en hemolinfa de todos los estadios larvarios, en pupa y adulto (Figura 7). En general, el nivel de actividad PO fue menor en los primeros tres estadios y la fase del ciclo con significativamente mayor actividad PO fue en pupa (Figura 8). Los adultos tuvieron una menor actividad que los insectos en fase de pupa, prepupa y 4to estadio larvario, pero fueron similares a las del 5to y 2do estadio.

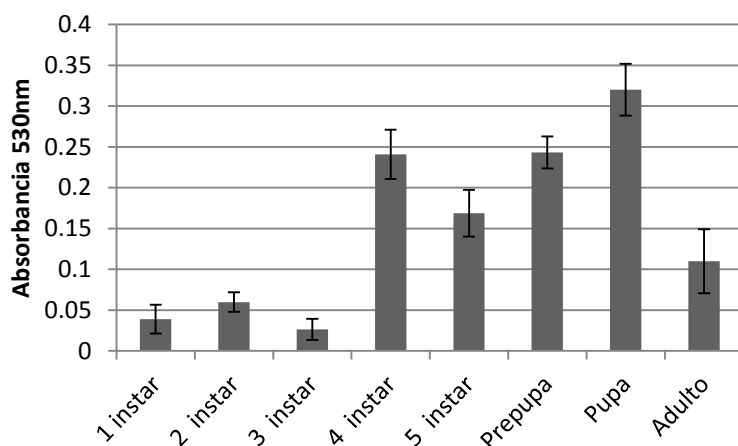


Figura 8. Actividad fenol oxidasa en los diferentes estadios del ciclo de vida de *Plodia interpunctella*. Las barras sobre las columnas indican el valor de la desviación estándar. Promedio de 3 repeticiones

6.3.2 Detección de transcritos de *hemolina*

Se detectaron transcritos de *hemolina* en todos los estadios de *P. interpunctella*. La normalización entre el gen de interés y un gen constitutivo en base al análisis de densitometría, reveló que la expresión iba en aumento conforme pasaba al siguiente estadio larvario, detectándose mayor expresión en el quinto estadio y en pupa, decreciendo en pre-pupa y adulto (Figura 9).

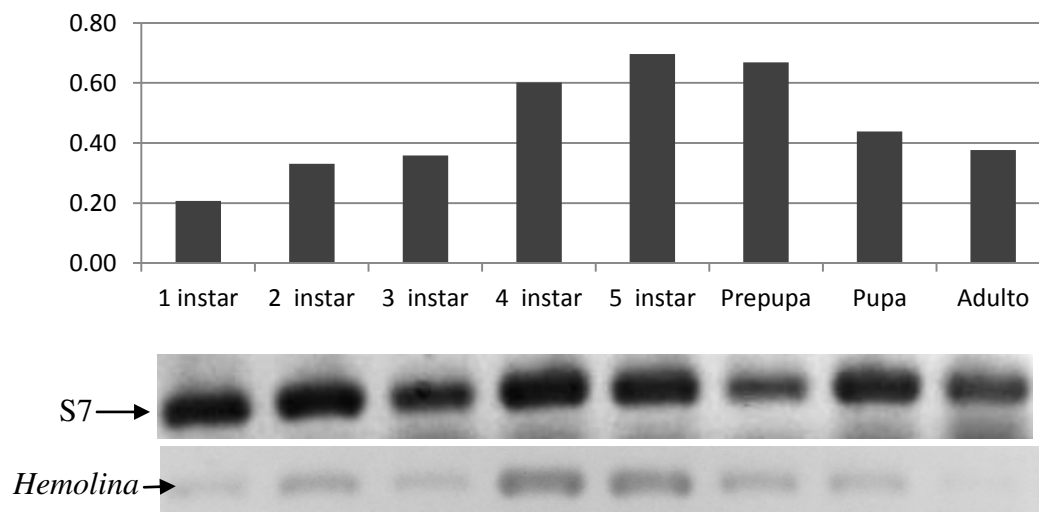


Figura 9. Detección de transcritos de *hemolina* normalizada con el gen constitutivo S7.

6.4 Efecto de diferentes antibióticos en la respuesta inmune de *P. interpunctella*

Para conocer el efecto de los antibióticos en la respuesta inmune de *P. interpunctella*, se probaron 50 $\mu\text{g/mL}$ de cada antibiótico por separado (dosis no inhibitorias de la microbiota) en larvas de tercer estadio. La hemolinfa extraída de las larvas tratadas presentó mayor actividad PO respecto al control, principalmente la combinación de estreptomicina/penicilina (Figura 10).

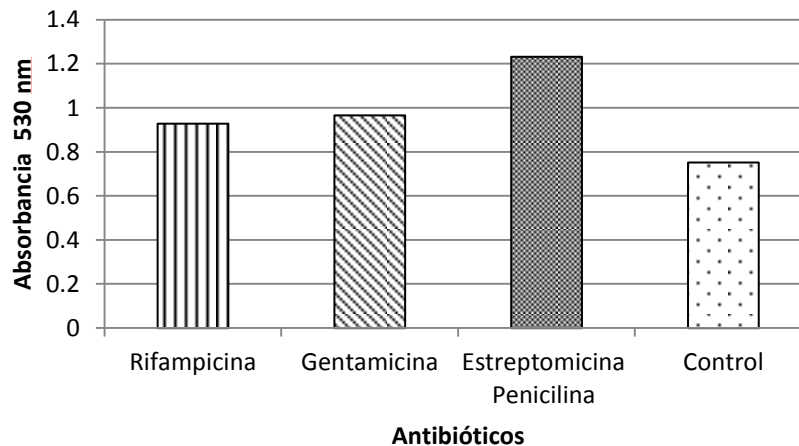


Figura 10. Actividad fenol oxidasa de larvas del tercer estadio de *P. interpunctella* tratadas con los diferentes antibióticos.

En cuanto el número de hemocitos totales, las larvas tratadas con antibióticos, presentaron un cambio en comparación con el control (Figura 11). El efecto de la gentamicina generó un promedio de 2.25×10^7 hemocitos/mililitro (Hem/mL), mostrando diferencias significativas al ($P < 0.05$) con los demás tratamientos incluyendo el grupo control 1.20×10^7 Hem/mL $F=6.8953_{,3,8}$ $P < 0.013$. El grupo expuesto a rifampicina promedió 1.50×10^7 Hem/mL.

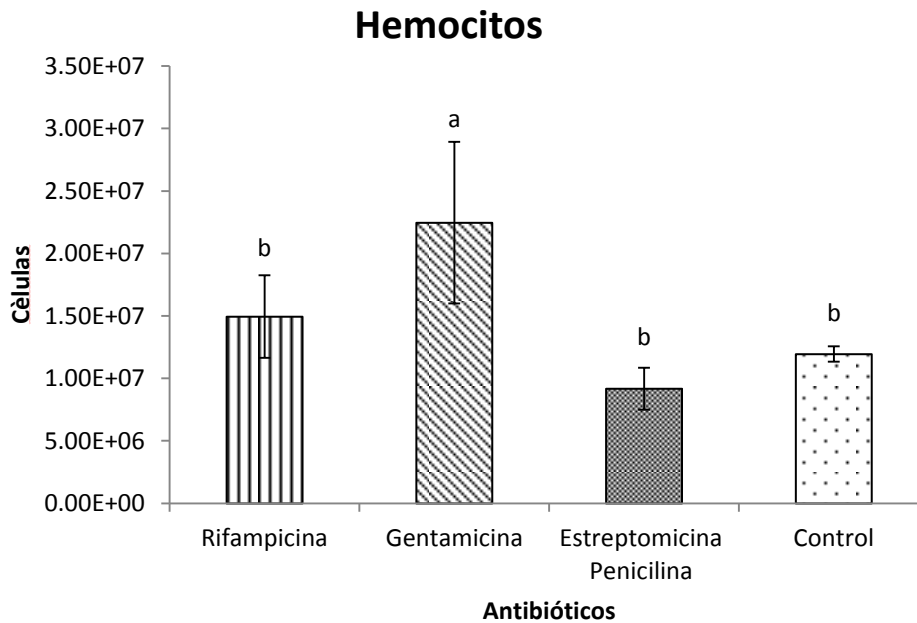


Figura 11. Número de hemocitos promedio de larvas de tercer estadio de *P. interpunctella* tratadas con dosis no inhibitorias de la microbiota de cada antibiótico por separado. Promedio de 3 repeticiones. Las barras sobre las columnas indican el valor de la desviación estándar, Diferentes letras sobre cada columna indican diferencias significativas (Tukey HSD, $\alpha=0.05$).

6.5 Respuesta inmune en larvas mantenidas en condiciones de esterilidad desde huevecillo

Las larvas mantenidas en condiciones de esterilidad desde huevecillo tuvieron en promedio 1.25×10^8 Hem/mL, 3.7 veces el número de hemocitos del control 3.37×10^7 Hem/mL (Figura 12).

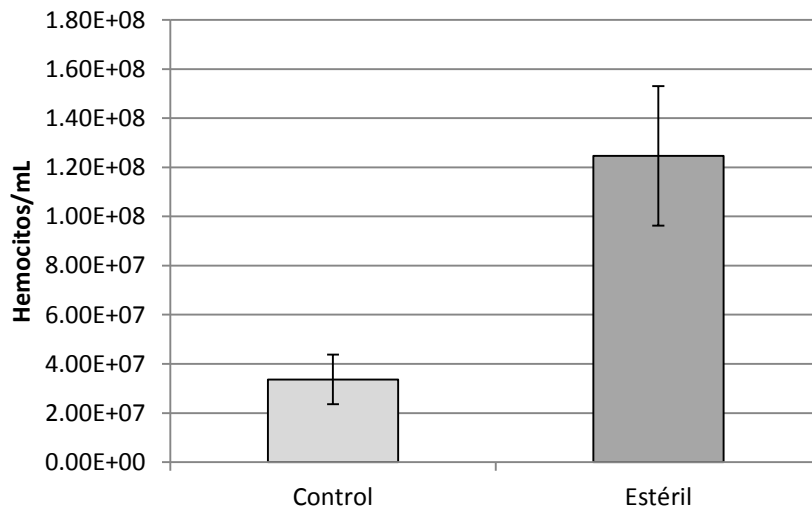


Figura 12. Comparación de número de hemocitos por mililitro de larvas mantenidas en condiciones de esterilidad desde huevecillo y control. Promedio de 3 repeticiones. Las barras sobre las columnas indican el valor de la desviación estándar.

Esta modulación podría ser explicada por la carencia de transcritos del gen de la *hemolina* como se muestra en la Figura 12.

De manera inversa al número de hemocitos, la expresión de *hemolina* se disminuyó en las larvas mantenidas en un régimen de esterilidad, dichas larvas se mantuvieron en el quinto estadio larvario durante más de un mes, al romperse dicha esterilidad, las larvas puparon a los tres días.

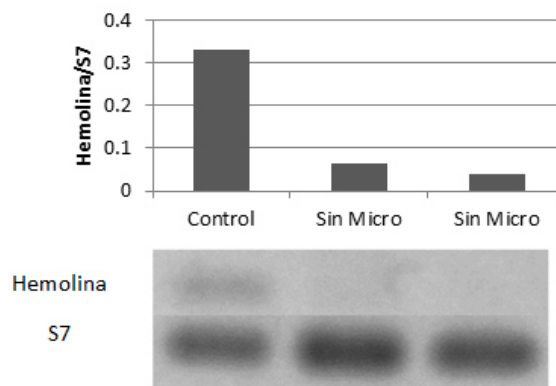


Figura 13. Detección de transcritos de *hemolinsin* en larvas desinfectadas desde huevecillo y mantenidas bajo condiciones de esterilidad. Sin Micro= sin microbiota.

6.6 Comparación de la susceptibilidad a Bt de *P. interpunctella* tratada con antibióticos.

Al comparar la susceptibilidad de larvas del tercer a cuarto estadio de *P. interpunctella* tratada con antibióticos al Bactospeine, se obtuvo una mortalidad promedio del 60% en el tratamiento de larvas expuestas a la CL₅₀ (Bt). Sin embargo, el tratamiento con la misma dosis pero en larvas alimentadas continuamente en dieta con antibiótico (A/Bt) tuvieron una mortalidad menor al 10%. Para determinar que este cambio fuese por el efecto de los antibióticos en la microbiota y no en el insecto, se utilizó un tratamiento similar al anterior, en donde las larvas eran alimentadas con dieta con antibióticos y después se pasaban bajo condiciones de esterilidad a dieta estéril sin antibióticos (tratamiento AE), posteriormente se expusieron a Bt en dieta estéril (tratamiento AE/Bt). Bajo estas condiciones se obtuvo una mortalidad del 21%, siendo significativamente menor que con el tratamiento con Bt, y mayor comparado con el tratamiento A/Bt. En cuanto a los controles negativos sin Bt, (larvas en dieta normal control, y larvas en dieta con antibióticos A y AE, en ninguno se observó una mortalidad significativa (Figura 14) con una F= 36.9_{5,12} y una P<0.001.

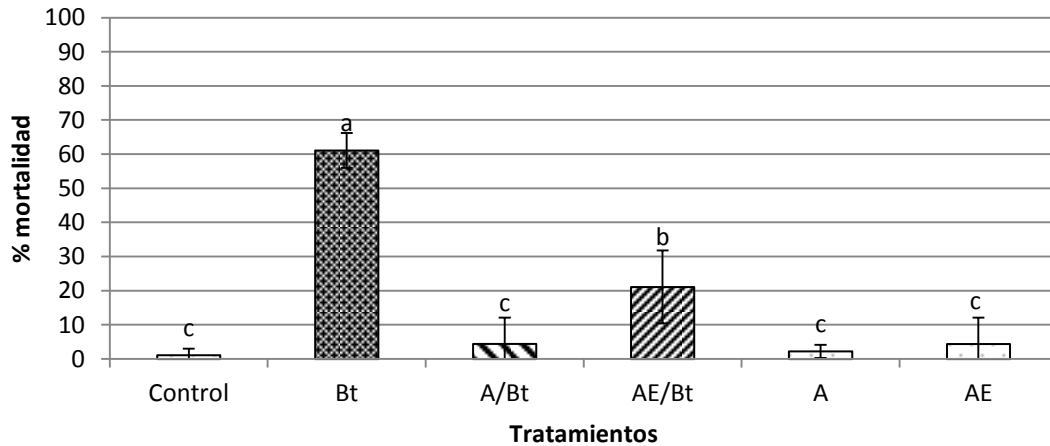


Figura 14. Porcentaje de mortalidad de larvas expuestas a Bt y antibióticos; donde A = dieta con antibióticos; AE = dieta estéril sin antibióticos. Las barras sobre las columnas indican el valor de la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican diferencias significativas (Tukey HSD, $\alpha=0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

6.6.1 Evaluación de respuesta inmune de *P. interpunctella* en los diferentes tratamientos de antibióticos y Bt.

6.6.1.1 Análisis de actividad fenol oxidasa

En cuanto la actividad PO, no se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos A/Bt y A, en los tratamientos Bt, AE/Bt y AE disminuyó dicha actividad significativamente con una $F= 20.3_{,5,12}$ y una $P<0.000$, principalmente en el tratamiento AE/Bt (Figura 15).

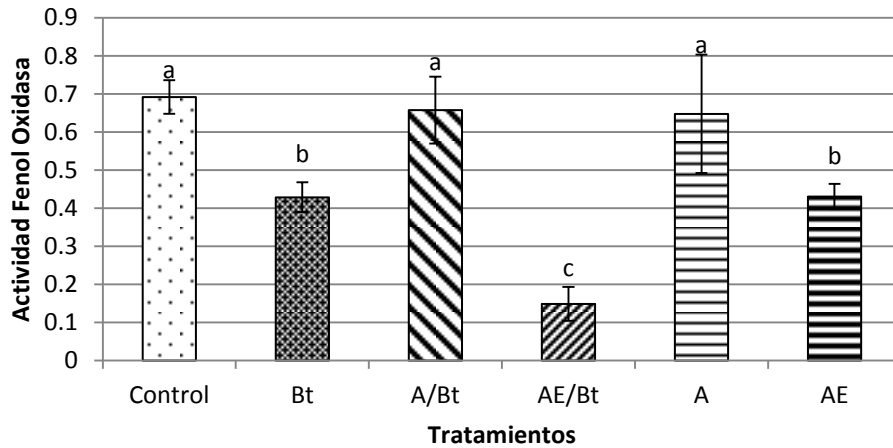


Figura 15. Actividad fenol oxidasa en hemolinfa de larvas bajo diferentes tratamientos; donde A = dieta con antibióticos; AE = dieta estéril sin antibióticos. Las barras sobre las columnas indican el valor de la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican diferencias significativas (Tukey HSD, $\alpha=0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

6.6.1.2 Conteo de hemocitos

Las larvas tratadas con la CL_{50} tuvieron el menor número de hemocitos 7.16×10^6 Hem/mL siendo un 60.8 % más bajo que el control 1.83×10^7 Hem/mL (Figura 16). El número de Hem/mL en las larvas del tratamiento A/Bt fue mayor que en todos los tratamientos. Sin embargo, entre los tratamientos AE/Bt, A y AE no se encontraron diferencias significativas $F_{5,12} = 10.64$, $P < 0.001$. En general, tanto los antibióticos como la ausencia de microbiota aumentan el número de Hem/mL.

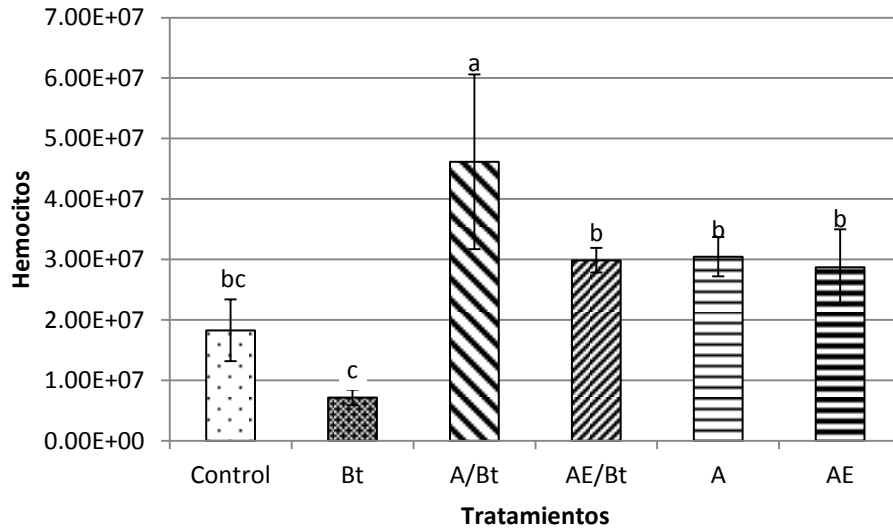


Figura 16. Número de hemocitos por mL hemolinfa de larvas bajo diferentes tratamientos, donde A = dieta con antibióticos; AE = dieta estéril sin antibióticos. Las barras sobre las columnas indican el valor de la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican diferencias significativas (Tukey HSD, $\alpha=0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

6.6.1.3 Detección de transcritos de *hemolina*

En base a los resultados de densitometría y normalización con el gen de la proteína ribosomal *S7* como constitutivo, todos los tratamientos mostraron una menor detección de transcritos de *hemolina* respecto al control (Figura 17).

Las larvas del tratamiento Bt tuvieron menor expresión de *hemolina*, mientras que los tratamientos con antibiótico (A y AE) tuvieron una expresión mínima del mismo. Sin embargo, al ser expuestas las larvas a Bt (A/Bt, AE/Bt) su expresión fue mayor, inclusive comparadas con las expuestas a Bt sin ser tratadas con los antibióticos (Figura 17).

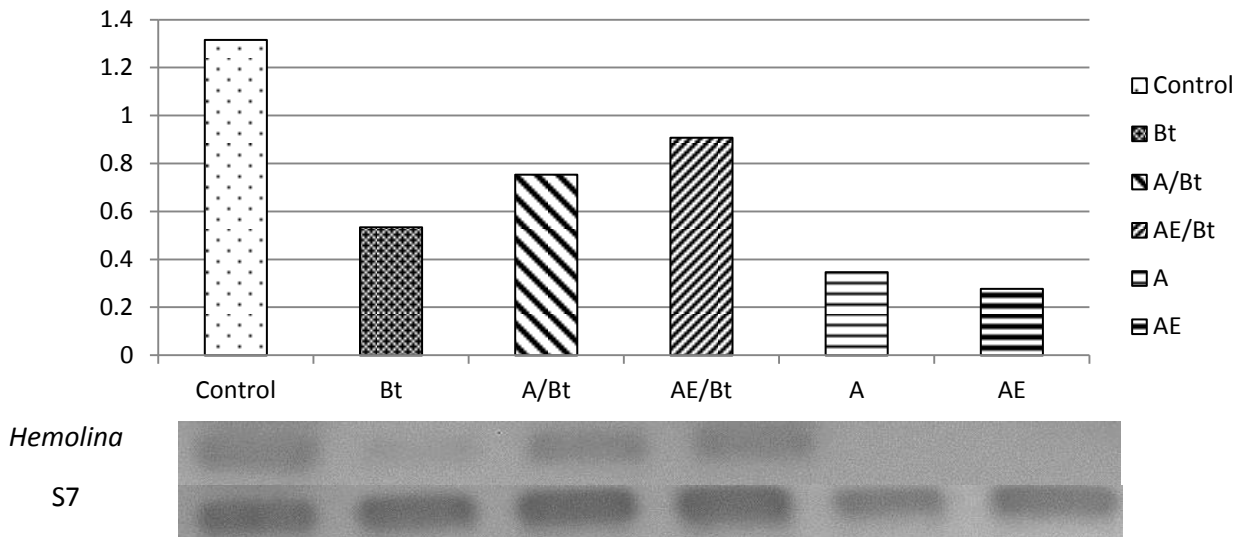


Figura 17. Detección de transcritos de *hemolina* en base al análisis de densitometría y normalización con el gen constitutivo, donde A = dieta con antibióticos; AE = dieta estéril sin antibióticos.

6.7 Susceptibilidad a Bt de larvas mantenidas estériles desde huevecillo.

Las larvas desinfectadas desde huevecillo y mantenidas bajo condiciones de esterilidad, tuvieron una mortalidad significativamente menor al ser expuestas a la CL_{50} estimada, pero tuvieron una significativamente mayor mortalidad comparadas con el control (Figura 18).

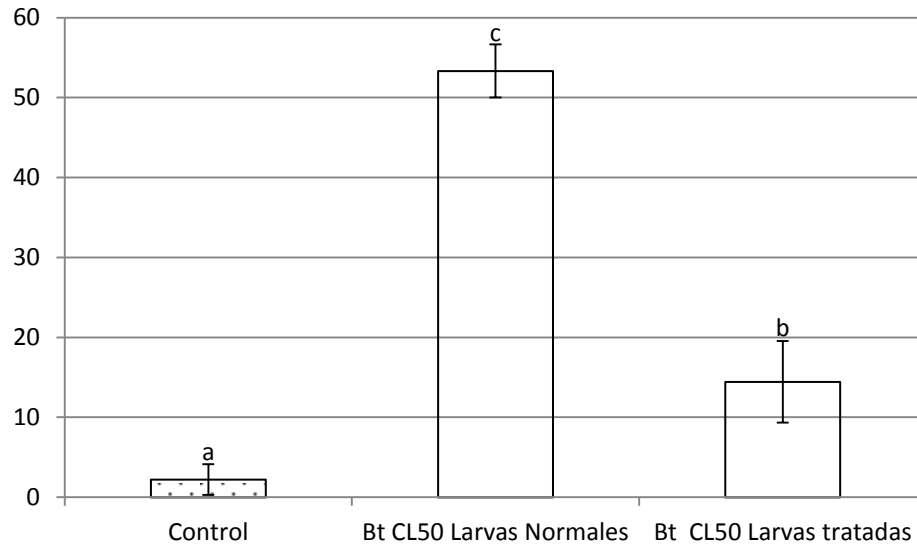


Figura 18. Susceptibilidad a Bt de larvas estériles desde huevecillo, donde A = dieta con antibióticos; AE = dieta estéril sin antibióticos. Las barras sobre las columnas indican el valor la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican diferencias significativas (Tukey HSD, $\alpha=0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

6.8 Identificación de la microbiota del intestino de *P. interpunctella* mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

En base a las secuencias de las clonas ARNr 16S, en la mayoría de los casos se identificó a nivel de género utilizando la página <http://rdp.cme.msu.edu/> del *Ribosomal Database*. Los resultados mostraron secuencias relativas a ocho géneros diferentes y tres no clasificables (Tabla 2).

Tabla 2. Resultado de identificación a nivel de género de las clonas en base al *Ribosomal Database*.

Filo	Clasificación Clase, orden, familia, género
<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i> (8)	» » » <i>class Chloroplast</i> (8) » » » » <i>family Chloroplast</i> (8) » » » » » <i>genus Streptophyta</i> (8)
<i>Phylum Firmicutes</i> (3)	» » <i>Bacilli</i> (3) » » » <i>Bacillales</i> (3) » » » » <i>Bacillaceae</i> 1 (2) » » » » » <i>Bacillus</i> (2) » » » » » <i>inclasificable Bacillales</i> (1) posiblemente <i>Salirhabdus</i> [63%]
<i>Proteobacteria</i> (26)	» » <i>Alphaproteobacteria</i> (6) » » » <i>Rhizobiales</i> (5) » » » » <i>Methylobacteriaceae</i> (5) » » » » » <i>Methylobacterium</i> (5) » » » » » <i>inclasificable Alphaproteobacteria</i> (1) » » <i>Betaproteobacteria</i> (7) » » » <i>Burkholderiales</i> (7) » » » » <i>Alcaligenaceae</i> (7) » » » » » <i>Parapusillimonas</i> (1) » » » » » <i>Achromobacter</i> (6) » » <i>Gammaproteobacteria</i> (13) » » » <i>Xanthomonadales</i> (1) » » » » <i>Xanthomonadaceae</i> (1) » » » » » <i>Stenotrophomonas</i> (1) » » » <i>Pseudomonadales</i> (12) » » » » <i>Pseudomonadaceae</i> (12) » » » » » <i>Pseudomonas</i> (11) » » » » » <i>inclasificable Pseudomonadaceae</i> posiblemente <i>Serpens</i> [53%] (1)
<i>Actinobacteria</i> (5)	» » <i>class Actinobacteria</i> (5) » » » <i>subclass Actinobacteridae</i> (5) » » » » <i>order Actinomycetales</i> (5) » » » » » <i>suborder Propionibacterineae</i> (4) » » » » » » <i>family Propionibacteriaceae</i> (4) » » » » » » » <i>genus Propionibacterium</i> (4) » » » » » <i>suborder Corynebacterineae</i> (1) » » » » » » <i>family Corynebacteriaceae</i> (1) » » » » » » » <i>genus Corynebacterium</i> (1)

Entre paréntesis se presenta el número de secuencias pertenecientes a cada grupo.

De las 42 clonas secuenciadas se obtuvieron 14 unidades taxonómicas operacionales por sus siglas en inglés (OTUs) diferentes, la mayoría de las secuencias pertenecen al

filo de las Proteobacterias en un 62%, Cianobacterias en 19%, Firmicutes en 7%, y Actinobacterias en el 12% (Figura 19). Dentro de las clases de las Proteobacterias el 31% correspondía a las γ -proteobacteria, 17% a β -proteobacterias y 14% a las α -proteobacterias. El índice de diversidad de Shannon-Weaver calculado fue de $H=2.10$.

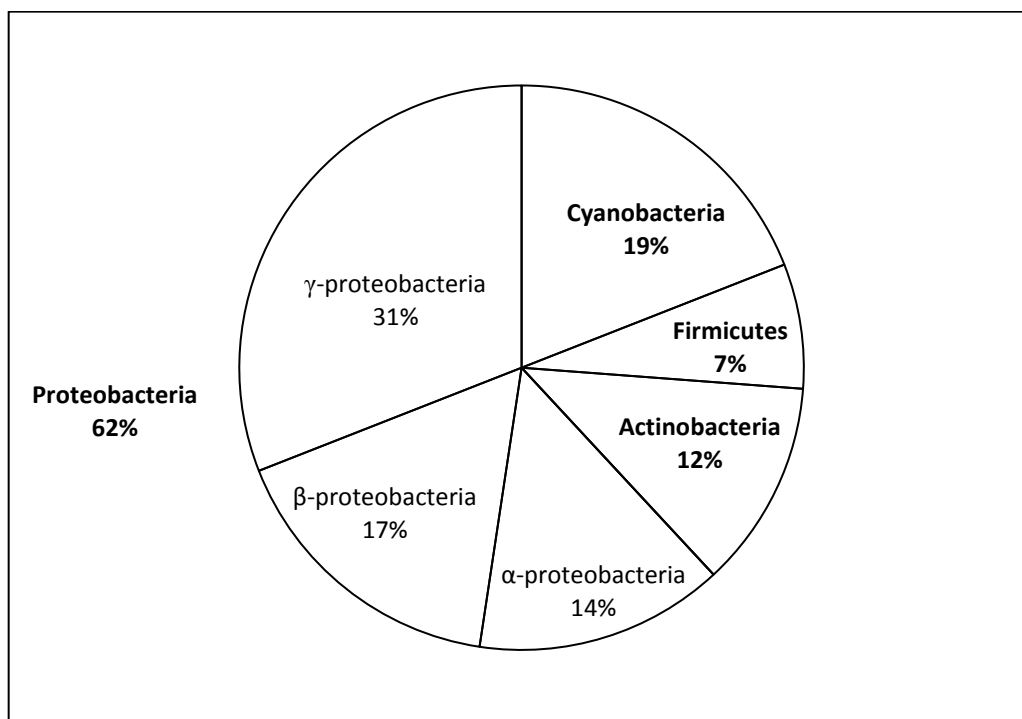


Figura 19. Porcentaje de clonas pertenecientes a cada filo de bacterias.

El árbol filogenético óptimo se obtuvo con una suma de las ramas de 3.08. El análisis se produjo en base a 155 secuencias de ADN. Todos los *gaps* y secuencias erróneas fueron eliminadas. Hubo un total de 856 posiciones en el último conjunto de datos (Figura 20).

Las secuencias que se agruparon a nivel de especie fueron: *Pseudomonas stutzer*, *Methylobacterium popul*, *Propionibacterium acnes*. Las bacterias del género *Bacillus* no se pudieron agrupar dentro ninguna de las especies usadas como referencia, inclusive

cuando en base al alineamiento en *BLAST* tenían una similitud del 99% con *B. cereus* y *B. thuringiensis*.

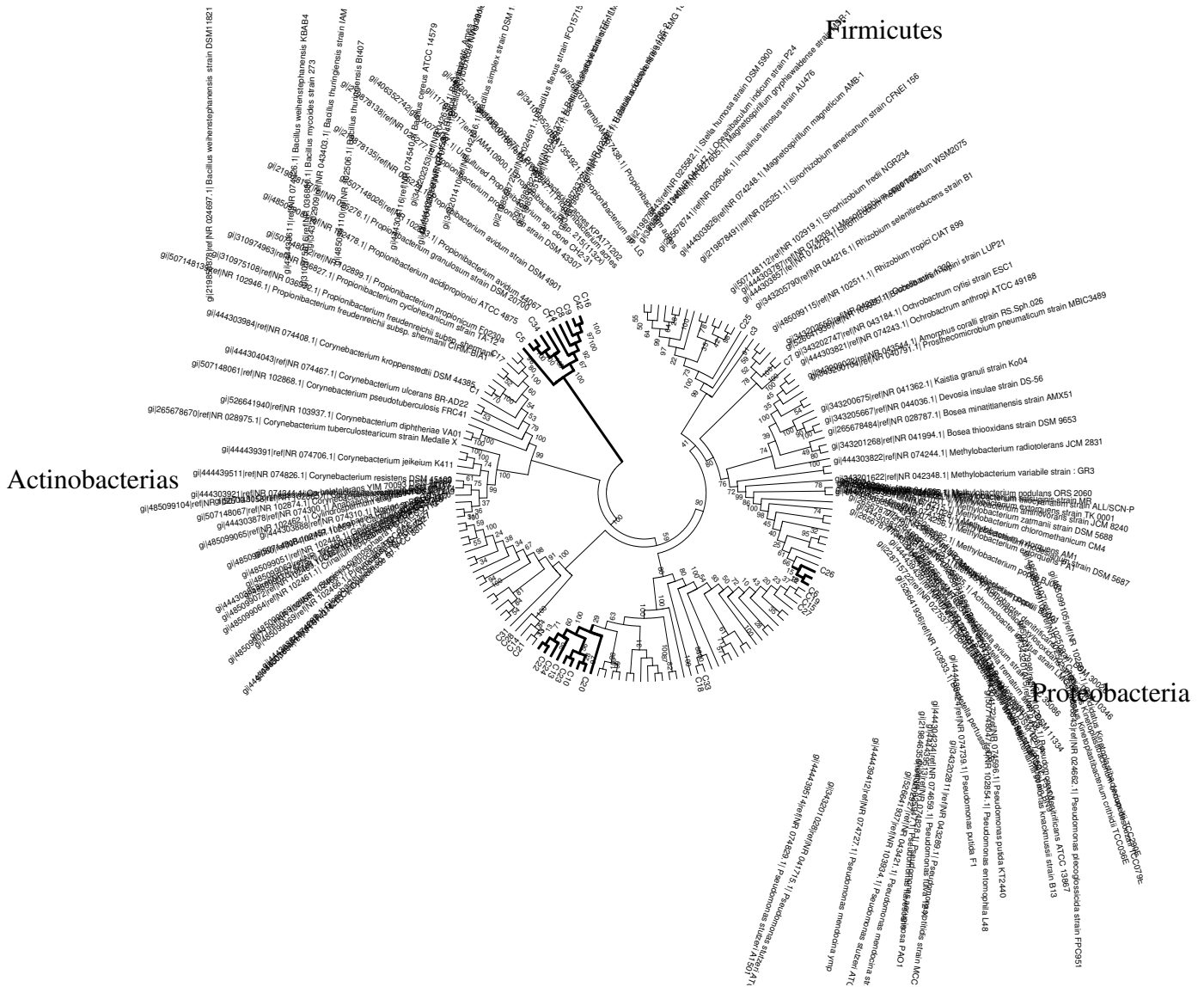


Figura 20. Agrupación filogenética de las secuencias del ARNr 16S de intestino de *P. interpunctella* y las secuencias de referencia.

7. Discusión

La producción y uso excesivo de insecticidas químicos para el control de insectos plaga han causado un considerable daño al medio ambiente y a la salud humana. Por lo cual el estudio y uso de microorganismos patógenos de insecto como bioinsecticidas es fundamental para el establecimiento de una agricultura sostenible que cubra las nuevas necesidades de alimentación. El estudio y comprensión de la biología de insectos plaga, así como las interacciones con sus patógenos, puede ayudar a potenciar su efecto, dentro de estas interacciones Broderick *et al.* (2006-2010), resaltan la importancia de la microbiota intestinal en la susceptibilidad de lepidópteros plaga a Bt, en donde al eliminar la microbiota intestinal mediante antibióticos, encontraron que la susceptibilidad a Bt disminuía considerablemente. Esto fue refutado por los trabajos de Frankenhuyzen *et al.*, (2010) y Johnston y Crickmore (2009), quienes relacionaron que los cambios en la susceptibilidad de insectos a Bt no se debían a la carencia de microbiota, sino al efecto de los antibióticos en el insecto.

En este trabajo se realizó una metodología similar; sin embargo, además de la mortalidad se midieron otras variables, se evaluaron cambios en la actividad de la fenol oxidasa, en el número de hemocitos y en la detección transcritos de *hemolina* como indicadores de respuesta inmune.

Por otra parte, se encontró que a dosis bajas de cada uno de los antibióticos evaluados por separado, estos activaban la respuesta inmune del insecto, generando un aumento en la actividad fenol oxidasa comparados con los insectos creciendo sin antibióticos (Figura 10), y presentaban un mayor número de hemocitos, principalmente los expuestos al antibiótico gentamicina (Figura 11).

Debido a que los antibióticos empleados podrían opacar de efecto de la microbiota intestinal en la inmunidad de insectos, se utilizó un tratamiento en el cual los

antibióticos se usaban en un principio sólo para eliminar la microbiota y después se mantuvieron en condiciones asépticas hasta el momento de los bioensayos. Este tratamiento se comparó contra insectos mantenidos en condiciones de esterilidad a partir de huevecillos desinfectados con cloro.

Al evaluar la mortalidad de *P. interpunctella* expuesta a Bt bajo diferentes condiciones de presencia/ausencia de microbiota intestinal disminuida con y sin antibióticos, encontramos resultados parecidos a lo publicado por Broderick *et al.* (2006-2010). Al exponer a *P. interpunctella* a antibióticos y a la CL₅₀ de Bt, no se obtenía mortalidad significativa comparada con el control (Figura 14); sin embargo, la concentración de hemocitos por mL de las larvas fue mayor en dicho tratamiento respecto al control negativo (Figura 16), lo cual concuerda con la explicación de Frankenhuyzen *et al.*, 2010 de que estos cambios en susceptibilidad pudieran no deberse a la ausencia de la microbiota, sino por el efecto del antibiótico en el insecto. Aun así, en el tratamiento AE en el cual los intestinos de las larvas eran tratados con antibióticos para eliminar la microbiota y después se alimentaron en dieta estéril sin antibiótico para posteriormente ser expuestas a Bt impregnado en dieta nueva (tratamiento AE/Bt) y eliminar el efecto del antibiótico en el insecto (Figura 14), se observaron diferencias significativas con respecto al control, obteniéndose una mortalidad del 20% y un número de hemocitos menor que con el tratamiento anterior, sin diferencias significativas respecto a los hemocitos de los insectos de los tratamientos que carecían de microbiota (Figura 14, tratamientos A y AB). Esta interacción antibióticos-microbiota incrementó la respuesta inmune basal del insecto.

Por otra parte, el efecto de los antibióticos mantuvo los niveles de actividad fenol oxidasa sin diferencias respecto al control, mientras que tanto la exposición a Bt, así como la ausencia de microbiota en el intestino de larvas sin antibiótico provocó una reducción de la actividad fenol oxidasa. Es decir, los insectos tratados con estos dos factores (Figura 15, tratamiento AE/Bt) presentaron una actividad fenol oxidasa menor.

Contrario a la idea general de que la exposición a bacterias provoca la activación de la transcripción de la *hemolina*, la detección de este transcrito fue menor en las larvas tratadas únicamente con la CL₅₀ de Bt comparado con larvas control. De igual manera, las larvas expuestas a los antibióticos tuvieron una reducción de transcritos de *hemolina* (Figura 17), lo que concuerda con los resultados reportados en *Bombyx mori* por Wan *et al.* (2013), en donde sugieren que en vez de aumentar dicha expresión, ésta se reduce en la mayoría de los casos en infecciones con bacterias Gram negativas (como *E. coli*) y Gram-positivas (como *B. thuringiensis*). Las infecciones bacterianas y/o exposición a Bt puede provocar una reacción contraria en diferentes especies, reduciendo o disminuyendo dicha expresión.

Esta capacidad de Bt de reducir la respuesta inmune basal en insectos ya ha sido descrita (Dalhammar y Steiner, 1984; Fedhila *et al.*, 2002), debido al efecto del inhibidor de la exoproteasa A, el cual degrada dos tipos de péptidos antimicrobianos (atacinas y cecropinas). Sin embargo, no hay reportes de que interfiera con la actividad fenol oxidasa a nivel de transcritos, ni afecta su metabolismo. En el caso de la hemolina, nuestros resultados sugieren una inhibición a nivel transcripcional, lo que conllevaría a un desorden en la modulación de la respuesta inmune y posiblemente a afectar el ciclo de vida del insecto. En el caso de los hemocitos, esta baja pudiese ser provocada por la pérdida de los mismos en las microagregaciones, o posiblemente por un efecto en el repertorio de diferenciación de los tipos de hemocitos y la fagocitosis, como respuesta a Bt. Otra posible explicación sería su relación con el costo fisiológico a la activación de su respuesta inmune, similar a los efectos reportados en otros lepidópteros expuestos a Bt (Ceron y Meyers, 2008; Gassmann *et al.*, 2009a,b), sus toxinas (Carrière *et al.*, 2010; Tamez-Guerra, 2010) o bacterias no patógenas (Freitak, *et al.*, 2007).

En otro experimento, cuando larvas esterilizadas desde huevecillo y mantenidas bajo condiciones de esterilidad hasta el tercer estadio se expusieron a la CL₅₀ de Bt, el porcentaje de mortalidad fue de un 14% (Figura 18), significativamente menor en

comparación con el efecto de los tratamientos AE/Bt (Figura 14). Los insectos mantenidos bajo estas condiciones sin la exposición a Bt también tuvieron un mayor número de hem/mL (Figura 12), y la ausencia de transcritos de *hemolina* (Figura 13).

En todos los casos la disminución de la microbiota intestinal no afectó al llamado *immune priming*, o preparación inmunológica, fenómeno en que a bajas concentraciones de bacterias se provoca una preparación inmunológica que puede permanecer después de varios estadios e inclusive de manera transgeneracional (Hernández-martínez *et al.*, 2010). Si la ausencia de microbiota inhibiera el *immune priming*, el efecto de las larvas tratadas con antibióticos y las larvas esterilizadas con cloro desde huevecillo y mantenidas en dieta estéril, serían afectadas teniendo un mayor porcentaje de mortalidad al ser expuestas a la CL₅₀ de Bt en comparación a las larvas bajo condiciones normales. Esto posiblemente se debió a que los insectos no fueron expuestos a bacterias que activaran la respuesta inmune de la misma forma que Bt. Este tipo de fenómenos ya se habían descrito por Sadd y Schmid-Hempel (2006).

Una de las funciones que se le adjudica a la hemolina es en el proceso de metamorfosis del estado larvario a pupa, esto sustentado en los análisis que describen un aumento en la expresión en los últimos estadios larvarios (Aye *et al.*, 2004; Bettencourt *et al.*, 2000), lo cual concuerda con nuestra descripción de la expresión de la *hemolina* mediante RT-PCR semicuantitativa de los diferentes estadios (Figura 9). Nosotros encontramos que dicha expresión iba en aumento hasta llegar al último estadio larvario y pre-pupa. Una de las observaciones más interesantes fue que las larvas a las que se le había erradicado la microbiota desde huevecillo y se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad, no pasaron del quinto estadio y no se detectaron transcritos de *hemolina*, de igual manera que las larvas expuestas a antibióticos. Esto demuestra que la microbiota intestinal es de importancia para la expresión de la *hemolina* y por ende para sus funciones. Yu y Kanost (1999) demostraron que la hemolina se expresa principalmente en el cuerpo gordo y en el tejido epitelial de los intestinos, en donde tendrían más

contacto con la microbiota (Freitak *et al.*, 2007; Noverr y Huffnagle, 2004) lo cual podría afectar la expresión de la *hemolina*. Posiblemente, esto explique lo sugerido al principio por Terenius (2008) sobre la activación de la hemolina por infecciones víricas y no bacterianas; sin embargo, esto podría haber sido por el efecto del aumento de la microbiota del insecto tras la infección por baculovirus, similar a lo reportado recientemente por Jakubowska *et al.* (2013). Sin embargo la activación de la hemolina en infecciones bacterianas y no víricas se ha evaluado en múltiples investigaciones (Terenius *et al.*, 2009; Aye *et al.*, 2004; Roxstrom-Lindquist *et al.*, 2005). Con respecto a nuestros resultados, estos sugieren que la microbiota es requerida para dicha activación.

En nuestra investigación, además del papel de los antibióticos y las interacciones con la microbiota y la tolerancia a Bt se analizó la microbiota y su diversidad en el intestino. En base a 42 clonas secuenciadas y los 14 diferentes OTUs encontrados (Tabla 2), con un índice de diversidad de Shannon-Weaver de $H=2.10$, se considera alto comparado con los reportes de Robinson *et al.* (2010) en otro lepidóptero (*Pieris rapae* L.), en la cual se evaluó la diversidad bacteriana mediante el mismo método empleado en este trabajo, pero en diferentes condiciones de dieta artificial; ellos encontraron un $H= 0.7-1.7$.

El micro bioma de *P. interpunctella* no se asemeja a los reportes de comunidades microbianas en otras especies de lepidópteros. Estudios en *Helicoverpa armígera* (Hübner) y *Spodoptera littoralis* (Boisduval), el mayor porcentaje de bacterias pertenece al género *Clostridium* y *Enterococcus* con un 42.2% y 42.3%, respectivamente; mientras que el orden Enterobacteriaceae sólo representó el 14.6% restante (Tang *et al.*, 2012). Mientras que en *P. rapae* las bacterias más encontradas fueron principalmente del género *Methylobacteria* (Robinson *et al.*, 2010), el cual se encontró en un 11% de las clonas de *P. interpunctella*, las cuales por su agrupación filogenética corresponden a la especie *Methylobacterium populi* (Figura 20) bacteria capaz de utilizar metanol y

metano como fuente de carbono entre otros compuestos orgánicos (Aken et al., 2004) lo cual podría ayudar a *P. interpunctella* a mantener su variada alimentación. El 9% de las clonas se identificó como *Propionibacterium acnés*, bacterias de este género producen: ácido láctico, ácido propiónico y ácido acético a partir de glucosa (Piveteau, 1999), lo cual podría aumentar su tolerancia a Bt, al bajar el pH alcalino del insecto, afectando la solubilidad de las toxinas Cry. Esta bacteria se ha reportado en *S. littoralis* y *H. armigera* (Tang et al., 2012).

La bacteria más abundante pertenece al género *Pseudomonas*, con un 26%, la cual filogenéticamente corresponde a *Pseudomonas stutzeri*, especie con actividad desnitrificante y capaz de degradar tetracloruro de carbono usado como insecticida en almacenes (Sepulveda-Torres et al., 1999), esta bacteria podría generar tolerancia del insecto a dicho insecticida. *P. stutzeri* se ha aislado del intestino del coleóptero *Costelytra zealandica* (Ray et al., 2007) e identificado mediante pruebas bioquímicas en el lepidóptero *Cydia pomonella* L. (Ertürk y Demirba 2006) y en pupas de *Rothschildia lebeau* (Pinto-Tomás et al., 2007). Otras de las bacterias encontradas (14%), pertenecen al género *Achromobacter*. En base a la identificación de las secuencias en el *ribosomal data base*, el 19% de estas pertenece a las cianobacterias; sin embargo, al comparar esas secuencias con las bases de datos del NCBI mediante BLAST, éstas tienen un 99% de similitud con secuencias de bacterias no cultivables encontradas en muestras ambientales (*Genbank* FM874215.1, GQ157582.1 y HM336171.1).

Dos secuencias pertenecen al género *Bacillus*, con un 98% de similitud con secuencias del NCBI para *Bacillus cereus* y *B. thuringiensis*, pero el análisis filogenético no lo agrupó junto con ninguna de las secuencias de referencia (Figura 20).

8. Conclusiones

1. La exposición de *P. interpunctella* a Bt afecta su respuesta inmune basal, reduciendo la actividad fenol oxidasa, el número de hemocitos y la expresión de *hemolina*.
2. La eliminación de la microbiota de *P. interpunctella* reduce la expresión de la *hemolina* y retarda el desarrollo del insecto.
3. La ausencia de microbiota de *P. Interpunctella* reduce sus susceptibilidad a Bt.

9. Literatura Citada

- Aken BV, Peres CM, Doty SL, Yoon JM, Schnoor JL. 2004 *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1191–1196.
- Allen HK, Cloud-Hansen K, Wolinski JM, Guan C, Greene S, Lu S, Boeyink M, Broderick N, Raffa KF, Handelsman J. 2009. Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA & Cell Biology*, 28(3):109-117.
- Arbogast RT, Chini SR. 2005. Abundance of *Plodia interpunctella* (Hübner) & *Cadra cautella* (Walker) infesting maize stored on South Carolina farms: seasonal and non-seasonal variation. *Journal of Stored Products Research*, 41: 528-543.
- Aye T, Lee KY, Kwon YJ. 2004. Cloning of immune protein hemolin cDNA from the indian meal moth, *Plodia interpunctella*, and its high induction during development and by bacterial challenge. *Entomological Research*, 34(4): 269–275.
- Bettencourt R, Assefa-Redda Y, Faye I. 2000. The insect immune protein hemolin is expressed during oogenesis and embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 95: 301–304.
- Betz FS, Hammond BG, Fuchs LR. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32:153-173.
- Bliss CI. 1934. The method of probits. *Science*, 79(2037): 38-39.
- Broderick N, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1):293-300.
- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41):15196–15199.
- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. 2010. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *BMC Microbiology*, 10(129).
- Broderick NA, Robinson CJ, McMahon MD, Holt J, Handelsman J, Raffa KF. 2009. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biology*, 7(11).

- Bulet P, Stöcklin R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters*, 12(1): 3–11.
- Candas M, Loseva O, Oppert B, Kosaraju P, Bulla LA. 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the Indianmeal moth larval gut Proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2:19-28.
- Carrière Y, Crowder DW, Tabashnik BE. 2010. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. *Evolutionary Applications*. 3 (5-6): 561-573.
- Caron V, Myers JH. 2008. Positive association between resistance to *Bacillus thuringiensis* and overwintering survival of cabbage loopers, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomology Research*, 98(3):317-322.
- Cerón JA. 2001. Productos comerciales y nativos a base de *Bacillus thuringiensis*, En P. Caballero and J. Ferré [eds.], *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones*, Phytoma, España. pp. 153-168.
- Chan-Hee K, Ji-Won P, Nam-Chul, Hee JK, Bok LL. 2008. Innate immune response in insects: recognition of bacterial peptidoglycan and amplification of its recognition signal. *BMB reports*, 41(2):93-101.
- Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R. 2004. Bacterial insecticidal toxins. *Critical Reviews in Microbiology*. 30(1): 33-54.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Rie JV, Lereclus D, Baum J, Dean DH. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 807-813.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. 2009. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D141–5.
- Dalhammar G, Steiner H. 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *European Journal of Biochemistry*, 139: 247-252
- Dubovskiy IM, Krukova NA, Glupov VV. 2008. Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3): 360–362.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Ericsson JD, Janmaat AF, Lowenberger C, Myers JH. 2009. Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(2): 61–67.

- Ertürk O, Demirba Z. 2006. Studies on bacterial flora and biological control agent of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) African Journal of Biotechnology 5 (22):2081-2085
- Fabrick JA, Baker JE, Kanost MR. 2003. cDNA cloning, purification, properties, and function of a β -1,3-glucan recognition protein from a pyralid moth, *Plodia interpunctella*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33: 579–594.
- Fedhila S, Nel P, Lereclus D. 2002. The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route Journal of Bacteriology, 184(12):3296–3304
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.
- Ferré J, Van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Entomology, 47: 501-530.
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology, 74(8): 2461-2470
- Frankenhuyzen K, Liu Y, Tonon A. 2010. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. Journal of Invertebrate Pathology, 103(2): 124–31.
- Freitak D, Wheat CW, Heckel DG, Vogel H. 2007. Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. BMC Biology, 5(56).
- García-Lara S, Espinosa C, Bergvinson DJ. 2007. Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control. México, D.F.: CIMMYT.
- Garczynski SF, Crim JW, Adang MJ. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis. Applied and Environmental Microbiology, 57: 2816-2820.
- Gassmann AJ, Carrière Y, Tabashnik BE. 2009. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Entomology. 54 (1): 147-163.
- Gassmann AJ, Fabrick JA, Sisterson MS, Hannon ER, Stock SP, Carrière Y, Tabashnik BE. 2009. Effects of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* on phenoloxidase activity and susceptibility to entomopathogenic nematodes. Journal of Economic Entomology 102 (3): 1224-1232.
- Griffitts JS, Aroian RV. 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. BioEssays, 27:614-624.

- Hartzer KL, Zhu KY, Baker JE. 2005. Phenoloxidase in larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): molecular cloning of the proenzyme cDNA and enzyme activity in larvae paralyzed and parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59: 67–79.
- Hernández-Martínez P, Naseri B, Navarro-Cerrillo G, Escriche B, Ferré J, Herrero S. 2010. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Microbiology*, 12(10): 2730–2737
- Höfte H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2):242-245.
- Huang YH, Wang XJ, Zhang F, Huo XB, Fu RS, Liu JJ, Sun WB, Kang DM, Jung X. 2013. The Identification of a bacterial strain BGI-1 isolated from the intestinal flora of *Blattella Germanica*, and its anti-entomopathogenic fungi activity. *Journal of Economic Entomology*, 106(1): 43-49.
- Jakubowska AK, Vogel H, Herrero S. 2013. Increase in gut microbiota after immune suppression in baculovirus-infected larvae. *PLoS pathogens*, 9(5), e1003379. doi:10.1371/journal.ppat.1003379
- Johnson JA, Wang S, Tang J. 2003. Thermal death kinetics of fifth-instar *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(2):520-524.
- Johnston PR, Crickmore N. 2009. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15): 5094–5099.
- Ling E., Yu XQ. 2005. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(12):1356-1366.
- Marmaras VJ., Lampropoulou M. 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular signalling*, 21(2):186–195.
- Mbata GN, Shapiro-Ilan DI. 2005. Laboratory evaluation of virulence of Heterorhabditid nematodes to *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, 34(3):676-682.
- McGaughey WH. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229:193-195.
- McGaughey WH, Beeman RW. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 81: 28-33.

- McGaughey WH, Johnson DE. 1992. Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) resistance to different strains and mixtures of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 85: 1594-1600.
- Mohandassa S, Arthurb FH, Zhuc KY, Throneb JE. 2007. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. *Journal of Economic Entomology*, 43:302-311.
- Nansen C, Phillips T. 2004. Attractancy and toxicity of an attracticide for indianmeal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(2):703-710.
- Noverr MC, Huffnagle GB. 2004. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?. *Trends in microbiology*, 12(12): 562–568.
- Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH. 1997. Proteinase-mediated resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Journal of Biology and Chemistry*, 272: 23473-23476.
- Oppert B, Kramer KJ, Johnson DE, Upton SJ, McGaughey WH. 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 571-583.
- Perez-Mendoza J, Aguilera-Peña M 2004. Development, reproduction, and control of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), in stored seed garlic in Mexico. *Journal of Stored Products Research*, 40:409-421.
- Peyronnet O, Vachon V, Brousseau R, Baines D, Jean-Louis S, Laprade R. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of Lepidopteran insect midgut cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5):1679-1684.
- Pinto-Tomás A, Uribe-Lorío L, Blanco J, Fontecha G, Rodríguez C, Mora M, Janzen D, Chavarría F, Díaz J. Sittenfeld A. 2007. Actividades enzimáticas en aislamientos bacterianos de tractos digestivos de larvas y del contenido de pupas de *Automeris zugana* y *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera: Saturniidae). *Revista de Biología Tropical*, 55(2): 401-415.
- Piveteau, P. 1999. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Le Lait*, 79(1):23-41.
- Ray JL, Andersen HK, Young S, Nielsen KM, O’Callaghan M. 2007. An assessment of the potential of herbivorous insect gut bacteria to develop competence for natural transformation. *Environmental Biosafety Research*. 6: 135–147
- Robinson CJ, Schloss P, Ramos Y, Raffa KF, Handelsman J. 2010. Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut. *Microbial Ecology*, 59: 199-211.

- Roxstrom-Lindquist K, Assefaw-Redda Y, Rosinska K, Faye I. 2005. 20-Hydroxyecdysone indirectly regulates hemolin gene expression in *Hyalophora cecropia*. *Insect Molecular Biology*, 14(16): 645–652.
- Sadd, BM, Schmid-hempel P. 2006. Report insect immunity shows specificity in Protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology*, 16:1206–1210. doi:10.1016/j.cub.2006.04.047
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*”, 3rd edition, Vols 1–3. New York: CSH Laboratory Press.
- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research. *Plant Biotechnology Journal*, 9:283-300.
- Schmidt O. 2008. Insect immune recognition and suppression. In: *Insect Immunology*, Beckage, N. E. (eds) Elsevier: San Diego, CA, pp. 271-294.
- Schmidt O, Theopold U, Beckage NE. 2008. Insect and vertebrate immunity: key similarities versus differences. In: *Insect Immunology*, Beckage, N. E. (eds) Elsevier: San Diego, CA, pp. 1-24.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J. Feitelson JV. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):775-806.
- Sepulveda-Torres L, Rajendran N; Dybas MJ, Criddle CS 1999. Generation and initial characterization of *Pseudomonas stutzeri* KC mutants with impaired ability to degrade carbon tetrachloride. *Arch Microbiol* 171(6):424–429.
- Shannon CE. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
- Sideri M, Tsakas S, Markoutsas E, Lampropoulou M, Marmaras VJ. 2008. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology*, 123(4): 528–537.
- Smilanich AM, Dyer LA, Gentry GL. 2009. The insect immune response and other putative defenses as effective predictors of parasitism. *Ecology*, 90(6):1434–1440.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- SPSS. 2008. Version 17.0. SPSS Inc., an IBM Company. Chicago, Illinois.
- Stanley DW, Miller JS. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119(1):1–13.
- Strand MR. 2008. Insect hemocytes and their role in immunity. In: *Insect Immunology*, Beckage, N. E. (eds) Elsevier: San Diego, CA, pp. 25-49.
- Tamez-Guerra P. 2010. A review of U.S. and Mexican cooperation to develop insect resistance management and monitoring methods for surveying transgenic crops

- expressing *Bacillus thuringiensis* proteins: 2003 to 2010. *Southwestern Entomologist*, 35 (3): 373-382.
- Tamez-Guerra P, Damas G, Iracheta MM, Oppert B, Gomez-Flores R, Rodríguez-Padilla C. 2006. Differences in susceptibility and physiological fitness of mexican field *Trichoplusia ni* strains exposed to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 99(3):937-945.
- Tamez-Guerra P, Valadez-Lira JA, Alcocer-González JM, Oppert B, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2008. Detection of genes encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* (Hübner) exposed to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 218–227.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101:11030-11035.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Tang X, Freitak D, Vogel H, Ping L, Shao Y, Cordero EA, Andersen G, Westermann M., Heckel DG, Boland W. 2012. Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PloS one*, 7(7): e36978.
- Terenius O. 2008. Hemolin-A lepidopteran anti-viral defense factor?. *Developmental and comparative immunology*, 32(4): 311–316.
- Terenius O, Popham HJR, Shelby KS. 2009. Bacterial, but not baculoviral infections stimulate Hemolin expression in noctuid moths. *Developmental and Comparative Immunology*, 33: 1176–1185.
- Tsakas S, Marmaras VJ. 2010. Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7: 228–238.
- Valadez-Lira JA, Alcocer-Gonzalez JM, Damas G, Nuñez-Mejía G, Oppert B, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra P. 2012. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran pests after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Science* 12(80).
- Vallet-Gely I, Lemaitre B, Boccard F. 2008. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*. 6:302-313.
- Vallet-gely I, Lemaitre B, Boccard F. 2008. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews*, 6: 302-313.
- Vizioli J, Salzet M. 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacology Science*, 23(11): 494-496.

- Wan J, Zhou X, Zhou X. 2013. A review of innate immunity of silkworm , *Bombyx mori*. African Journal of Agricultural Research, 8(20): 2319–2325.
- Whalon ME, Wingerd B. 2003. Bt: mode of action and use. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 54: 200–211.
- Yu-Cheng Z, Kramer KJ, Oppert B, Dowdy AK. 2000. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30:215-224.
- Yu XQ, Kanost, MR. 1999. Developmental expression of *Manduca sexta* hemolin. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 42:198–212.
- Yu XQ, Kanost MR. 2004. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Developmental and Comparative Immunology, 28(9): 891–900.
- Zelensky AN, Gready JE. 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. The FEBS Journal, 272(24): 6179–6217.