

Selección de toxinas Cry contra *Trichoplusia ni* [□]

Magdalena Iracheta Cárdenas*, Luis Galán-Wong*, Juan Ferré-Manzanero**,
Benito Pereyra-Alfárez*



El éxito de los bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) se debe a la acción insecticida del cristal parasporal, el cual puede estar formado por una o varias proteínas llamadas d-endotoxina o proteínas Cry. Estas proteínas pueden ser tóxicas a diferentes órdenes de insectos, principalmente a lepidópteros, dípteros y coleópteros¹ y a ciertos nemátodos y protozoarios.^{2,3}

Aun y cuando a nivel de estructura primaria las proteínas Cry presentan diferencias, comparten un mismo patrón de activación y modo de acción.⁴ El cuadro tóxico se inicia cuando las larvas de insectos ingieren los cristales, las toxinas son solubilizadas y procesadas por proteasas del intestino medio, generando un fragmento tóxico, el cual se une a receptores específicos en las células epiteliales, formando poros en la membrana plasmática, ocasionando lisis celular y, comúnmente, la muerte.^{5, 6}

El paso que implica la unión al receptor juega, indudablemente, un papel importante en el modo de acción y éste ha sido correlacionado con la magnitud de la toxicidad.^{7, 8} Sin embargo, existen ejemplos muy claros donde la toxicidad es inversamente proporcional a la unión (afinidad),⁹ y en algunos insectos la afinidad de la toxina por el receptor no es suficiente para llegar a causar lesiones.¹⁰ Asimismo, la resistencia a Bt ha sido atribuida a una disminución en la afinidad por el receptor,^{11, 12, 13} y casos de resistencia cruzada han mostrado que este



Trichoplusia ni.

evento es probablemente debido al uso de toxinas muy relacionadas, especialmente con la subclase Cry1A.¹⁴ Reportes recientes han demostrado la aparición de resistencia cruzada en toxinas con menor grado de homología, como es el caso de *Plutella xylostella* y *Heliothis virescens* para las toxinas Cry1Ab y Cry1Fa.^{13, 15}

En general, el modo de acción de las proteínas Cry a nivel molecular, como es el reconocimiento de la toxina y la unión al receptor no es del todo clara, por lo que la caracterización de estos receptores, es un paso importante en la elucidación de este mecanismo, lo cual permitirá un mejor manejo de las toxinas de Bt, para evitar la aparición de resistencia en los insectos tratados.

Uno de los lepidópteros de mayor importancia en la agricultura es *Trichoplusia ni*, el cual es combatido con varios formulados de Bt cepa HD-1, que

□ El presente artículo está basado en la investigación «Toxicidad y unión a receptores de las d-endotoxinas de *Bacillus Thuringiensis* clase Cry1 *Trichoplusia ni*», galardonada con el Premio de Investigación UANL 1999, en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2000.

*Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

**Departamento de Genética, Facultad de CC. Biológicas, Universidad de Valencia.

contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A y Cry2B. En 1994, Estada y Ferré reportaron valores de susceptibilidad muy bajos para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac y demostraron la presencia de unión saturable a las vesículas del intestino medio, donde Cry1Ab y Cry1Ac comparten el mismo receptor. No obstante, también se han encontrado diferencias en la susceptibilidad de *T. ni* hacia estas toxinas, para la clase 1, se han encontrado valores de toxicidad con variaciones de 1 a 300 veces. En este punto nos preguntamos: ¿Las colonias de insectos del norte de México son igualmente susceptibles a las toxinas de la familia Cry1?, ¿A que proteínas Cry presenta mayor sensibilidad?, ¿La afinidad por el receptor es similar a diversas toxinas?

El objetivo general de este trabajo fue determinar el espectro de especificidad y toxicidad de las toxinas Clase Cry1 hacia *T. ni* y proponer un modelo de unión de la subclase Cry1A.

Materiales y métodos

Origen de los microorganismos: Las cepas de *B. thuringiensis* fueron obtenidas de la compañía Ecogen Inc. (Langhorne, Pennsylvania, E.U.A), y las señaladas como PGS y Cry2Aa fueron proporcionadas en forma de toxinas puras y activadas por la compañía Plant Genetic Systems (Gent, Bélgica), y por el Dr. William J. Moar (Universidad de Auburn, Alabama, EUA), respectivamente.

Obtención de proteínas Cry: Las cepas fueron inoculadas en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de caldo CCY¹⁶ e incubados a 29°C en agitación constante hasta esporulación (48-96 h). Las toxinas fueron solubilizadas en tampón de carbonatos (Na₂CO₃, 50 mM; NaCl, 0.1 M; DTT, 10 mM) pH 11.5 e incubadas 2 h en agitación constante a temperatura ambiente (TA). La mezcla fue centrifugada (14 000 Xg). El pH del sobrenadante fue ajustado pH 8.0 y se adicionó tripsina tipo XIII, tratada con TPCK (Sigma), en una relación de 1: 20 (mg tripsina / mg de toxina solubilizada). La mezcla fue incubada por 2 h/ 37°C y centrifugada a 14 000 Xg.¹⁷ Al sobrenadante se le determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.¹⁸ Purificación por FPLC: Las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac fueron filtradas a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 mm, y purificadas por FPLC con una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) equilibrada con Tampón A (Tris 20

mM pH 8.6). La elución se realizó mediante un gradiente de 0-60% de Tampón B (Tris 20 mM, NaCl 1M pH 8.6).

Ensayos de toxicidad: La colonia de insectos fue obtenida de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Los bioensayos se realizaron con las toxinas activadas contra larvas neonatas de *T. ni*. La LC₅₀ fue calculada por análisis probit¹⁹ mediante el programa POLO-PC.

Marcaje con NaI¹²⁵: Las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (12 mg) fueron marcadas con 0.5 mCi de Na I¹²⁵ usando cloramina T.²⁰ El yodo libre y posibles restos de hidrólisis fueron separados en una columna de Biogel P-30 (BioRad). La radioactividad específica fue de 2.0, 1.07 y 2.2 mCi/mg de proteína respectivamente.

Obtención de vesículas del intestino medio (BBMV): Las BBMV fueron obtenidas usando, esencialmente, el método descrito previamente.²¹ La concentración de proteínas fue calculada por el método de Bradford y el rendimiento de BBMVs se calculó a partir de los mg obtenidos / g de intestinos.

Unión I¹²⁵-Cry- Receptor (I¹²⁵-Cry1Ab y I¹²⁵-Cry1Ac): Los ensayos de unión se realizaron esencialmente de acuerdo a lo reportado por Estada y Ferré (1994). Las toxinas marcadas fueron incubadas por 1 h a TA con las BBMV en un volumen total de 100 ml de PBS- BSA 0.1%. Para los ensayos de competencia, 10 mg de BBMV, 0.25 nM de Cry1Ab o 0.12 nM de Cry1Ac fueron incubadas 1 h a TA con cantidades crecientes de toxina sin marcar. Las reacciones se pasaron a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F, que fueron previamente incubados en PBS-BSA 0.5%. La muestra se lavó inmediatamente con 5 ml de PBS-BSA 0.1% frío, los filtros se depositaron en tubos y se midió la radiactividad. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa LIGAND.²²

Resultados

Bioensayos: Los valores de LC₅₀ mostraron grandes diferencias en la susceptibilidad de *T. ni* hacia las diferentes toxinas evaluadas. Las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac (independientemente de la fuente), Cry1C y Cry1J resultaron altamente tóxicas, con valores de LC₅₀ menores a 100 ng/ cm². Cry 1F resultó moderadamente tóxica con LC₅₀ de 248.8 ng/cm² y las toxinas restantes no mostraron toxicidad, aún a con-

Tabla I. Toxicidad de las proteínas clase X_2 Cry1 y Cry2Aa contra las larvas neonatas de *T. ni*

Toxina	LC ₅₀	FL ₉₅	Pendiente
Cry1Aa (EG)	8145.6	4 719 - 25 851	1.8
Cry1Aa (PGS)	420.4	310.2 - 503.4	3.3
Cry1Ab (EG)	3.4	2.3 - 4.0	1.9
Cry1Ab (PGS)	4.4	1.9 - 8.3	1.2
Cry1Ac (EG)	1.1	0.7 - 1.7	1.7
Cry1Ac (PGS)	4.1	2.4 - 6.6	1.6
Cry1Ac (HD-73)	7.5	3.9 - 15.7	1.1
Cry1Ba (EG)	>6,200		
Cry1Ca (EG)	12.2	5.0 - 20.5	1.7
Cry1Da (EG)	>2,500		
Cry1Ea (EG)	>6,200		
Cry1Fa (EG)	248.8	117 - 463.5	3.24
Cry1Ja (EG)	87.4	37.8 - 189.0	0.9
Cry2Aa	34.2	22.0 - 51.8	1.4

EG cepas de Ecogen; PGS cepas de Plant Genetic Systems; FL = límites de confianza al 95%.

centraciones mayores de 2 500 ng/cm² (Cry 1B, 1Da y 1Ea). Un resultado sorprendente fue la variabilidad entre las toxinas Cry1Aa, ya que Cry1Aa EG (cepa de Ecogen) resultó ser no tóxica (LC₅₀ = 8145.6 ng/cm²), mientras que la de PGS fue alrededor de 20 veces más tóxica para *T. ni* (Tabla I). Para asegurar que la variación no fuese debido a la calidad de la toxina, se realizaron bioensayos con larvas del tercer estadio de *P. xylostella* (insecto susceptible a Cry1Aa) encontrándose una LC₅₀ = 2,8 mg/ml, valor normal para este insecto. De esta manera, se demostró que la toxina era activa.

Determinación de la concentración óptima de proteínas de vesículas: se determinó mediante experimentos de saturación de vesículas, para las toxinas I¹²⁵-Cry1Aa, I¹²⁵-Cry1Ab, y I¹²⁵-Cry1Ac. Se variaron las concentraciones de proteínas de vesículas desde 0.25 a 30 mg/ml y se mantuvo constante la cantidad de I¹²⁵-Cry1 previamente determinada.

Para I¹²⁵-Cry1Aa se obtuvo un porcentaje de unión total casi del 5%, sin embargo el porcentaje de unión específica no pudo determinarse, como para poder realizar posteriormente experimentos de competencia. Para I¹²⁵-Cry1Ab el porcentaje de unión máximo fue del 7.5% y el de unión inespecífica

de 0.8%, y para I¹²⁵-Cry1Ac se encontró un porcentaje máximo de unión de 8.0% y 2.5% de unión inespecífica. Basado en estos experimentos se decidió realizar los ensayos de unión con 10 mg y 7.5 mg de vesículas para Cry1Ab y Cry1Ac, respectivamente.

Competencias homólogas: Ensayos de competencia se realizaron para evaluar la unión a un nivel cuantitativo, entre I¹²⁵-Cry1Ab y un exceso de competidor Cry1Ab sin marca, lo mismo para I¹²⁵-Cry1Ac y su homólogo sin marca (figura 1). Los resultados muestran claramente un desplazamiento por la toxina homóloga fría, I¹²⁵Cry1Ab es desplazada por su homóloga a concentración de 0.1nM y a 10 nM alcanza un máximo de desplazamiento del 74%. Para I¹²⁵Cry1Ac, el desplazamiento se inicia a una concentración de competidor de 0.5 nM y el máximo a 10 nM, alcanzando un desplazamiento del 60 %.

Con los resultados de los experimentos de competencias homólogas, se calculó la constante de afinidad (kd) y la concentración de los sitios de unión (Rt) para las interacciones toxina-membrana. Las constantes de disociación y el número de sitios de unión calculados para ambas toxinas resultaron muy similares, Kd de 1.9 y 1.2; Rt de 0.59 y 0.54 para Cry1Ab y Cry1Ac, respectivamente (Tabla II).

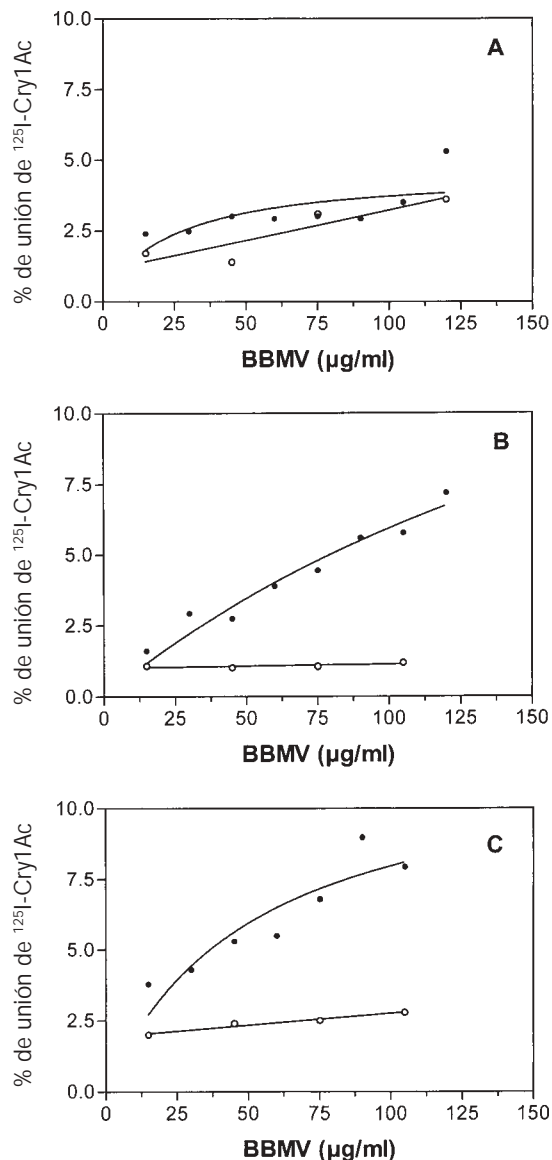


Figura 1.- Unión de las toxinas ^{125}I -Cry1Aa (A); ^{125}I -Cry1Ab (B); y ^{125}I -Cry1Ac (C), como función de la concentración de vesículas de intestino medio de *T. ni*. (I) Unión específica, (j) Unión inespecífica.

Competencias heterólogas: Los experimentos de competencias heterólogas para las toxinas ^{125}I -Cry1Ab y ^{125}I -Cry1Ac con las toxinas Cry 1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa, indican que hay un evidente desplazamiento de las toxinas marcadas por Cry1Ab y Cry1Ac, por lo que comparten los mismos sitios de unión, en cambio no hay desplazamiento por Cry1Aa o Cry1Fa (figura 2).

Estos resultados indican que Cry1Ab y Cry1Ac compiten por el mismo sitio de unión, mientras

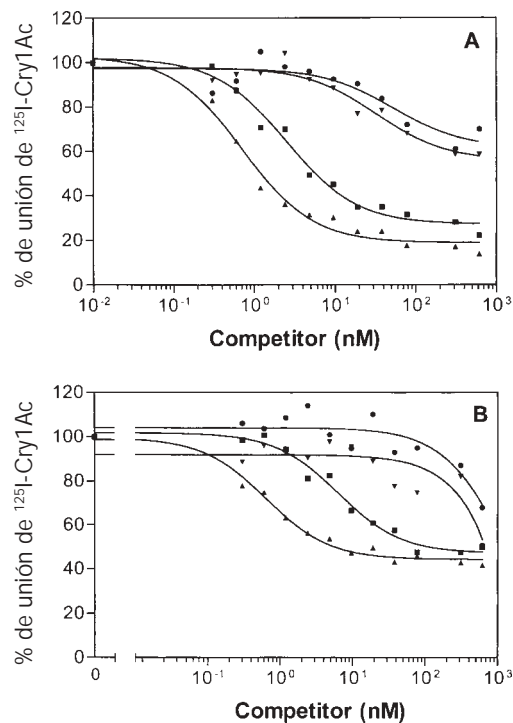


Figura 2.- Competencias homólogas entre ^{125}I -Cry1Ab-Cry1Ab y ^{125}I -Cry1Ac-Cry1Ac.

Cry1Aa y 1Fa, ambas presentan un sitio distinto, aunque Cry1Fa, aparentemente tiene una baja afinidad por el sitio de 1Ab, ya que a concentraciones mayores de 100 nm, esta puede llegar a ser desplazada. Con estos datos se propone un modelo de unión (Fig. 3).

Discusión

Diversos productos comerciales de *B. Thuringiensis* (Bt), formulados a base de una mezcla de esporas-cristales, se utilizan desde hace varias décadas como insecticidas biológicos. Los cristales de Bt, salvo algunas excepciones, están compuestos por varios tipos de proteínas Cry, donde cada una tiene diferente especificidad o espectro insecticida. Un ejemplo es la cepa HD-1 (Dipel), la cual está constituida por 5 proteínas Cry: 1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A y 2B, ²³ lo que la hace eficiente para controlar un gran número de lepidópteros; sin embargo, algunos insectos no son sensibles a estas toxinas, tal es el caso de los miembros del género *Spodoptera*, que son sensibles a Cry1C. Precisamente este alto grado de especificidad, determina la importancia de conocer exactamente qué tipo de proteínas Cry son las ade-

Competidor	Cry1Ab		Cry1Ac	
	K_d	R_t	K_d	R_t
Cry1Ab	2.0 (0.35)	0.59 (0.7)	9.7 (2.0)	0.46 (0.18)
Cry1Ac	0.27 (0.06)	0.64 (0.06)	1.3 (0.36)	0.54 (0.18)

Kd (nM); R_t (μ mol/mg). Los valores en paréntesis muestran el error estándar.

cuadas para controlar cada insecto.

En el caso de *T. ni*, el grado de susceptibilidad a las proteínas de la clase Cry1 presentó una amplia gama de toxicidad. Un resultado inesperado fue encontrar que la susceptibilidad hacia Cry1Aa podría depender de la procedencia de la proteína. De esta manera, la toxina de Ecogen (EG) resultó ser 20 veces menos tóxica que la procedente de Plant Genetic Systems (PGS) (LC_{50} = 8145 y 420 ng/cm² para EG y PGS, respectivamente). Sin embargo, ambas toxinas pueden considerarse como no tóxicas (Tabla I). Este resultado fue sorprendente ya que reportes previos habían demostrado que, aunque a diferente nivel, *T. ni* es susceptible a esta toxina.^{8, 24, 25} En un principio se sospechó que la variación en toxicidad podría deberse a la procedencia y tratamientos proteolíticos, por tal razón se realizaron bioensayos contra *P. xylostella*. El resultado demostró que Cry1Ac-EG presentó una LC_{50} de 2.8 mg/ml, lo que indica que la toxina fue procesada de forma eficiente.

Al comparar la toxicidad de Cry1Aa con Cry1Ab y Cry1Ac, para las que no se encontraron diferencias independientemente del origen de la toxina, se observó que 1Ab y 1Ac fueron 380 veces más tóxicas que Cry1Aa. Estos valores de toxicidad difieren con los reportados anteriormente por Estada y Ferré (1994), quienes encontraron LC_{50} de 570, 480 y 320 ng/cm² para Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, res-

pectivamente. La notable diferencia de sensibilidad para la subclase Cry1A en *T. ni*, no es del todo nueva, ya que para Cry1Ac se ha reportado que es 1.7;⁸ 22.6;²⁶ y 55²⁷ veces más tóxica que 1Aa; sin embargo, en este estudio encontramos que es 382 veces más potente (Tabla I).

En otros insectos como *H. virescens* estos patrones de toxicidad han mostrando diferencias en la toxicidad entre la subclase Cry1A. Se han publicado valores de LC_{50} para Cry1Ac de 29, 56, 48 y 2,000 veces más tóxica que Cry1Aa.¹⁷

Las diferencias en la sensibilidad de los insectos hacia las proteínas Cry pueden deberse, en gran parte, a tres aspectos involucrados en la evaluación de la toxicidad: a) Condiciones en las que se realiza el bioensayo (incorporación de la toxina en la dieta, extensión en superficie, tiempo de incubación, etc.). b) Fuente de las toxinas (diferentes toxinas se expresan en cepas recombinantes de *Escherichia coli* o Bt). c) La colonia del insecto (origen geográfico, distribución y migración).

Este último podría ser el factor más importante en la determinación de la sensibilidad de un insecto hacia diferentes toxinas Cry. Sin embargo, todos los factores involucrados en la patogenicidad hacia las larvas deben ser considerados.

Una vez que las toxinas han sido activadas en el intestino de la larva, éstas pueden sufrir proteólisis posteriores o precipitación en el intestino. Esto se ha visto en los lepidópteros *Choristeneura fumiferana* y *Lymantria dispar* donde se encontró que el jugo intestinal forma un complejo proteico que precipita selectivamente toxinas de la clase Cry1A.^{4, 28} Es posible que un evento similar ocurra en *T. ni* y que esto sea el motivo por el cual se observó la diferencia tan grande en la susceptibilidad hacia la subclase Cry1A.

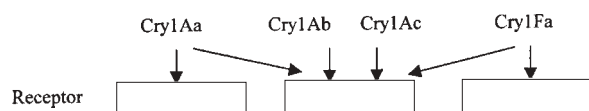


Figura 3.- Modelo de unión de las toxinas Cry.

La toxicidad encontrada de la subclase Cry1A hacia *T. ni* se correlaciona claramente con los ensayos de unión, usando vesículas marcadas radioactivamente, donde se encontró que Cry1Aa, que es no tóxica, no se une de manera saturable a las proteínas de vesículas, en cambio Cry1Ab y Cry1Ac, que resultaron altamente tóxicas presentan una unión altamente específica, con valores de Kd y Rt muy similares entre ambas. Estos valores concuerdan con los publicados anteriormente,⁸ no obstante presentar valores de toxicidad mucho menores.

Con estos ensayos de unión y competencia, se puede establecer un modelo de unión en los receptores de *T. ni*, donde Cry1Ab y Cry1Ac comparten el mismo sitio de unión, Cry 1Aa y Cry1Fa, presentan un sitio independiente de unión, aunque con menos afinidad Cry1Fa comparte el sitio de Cry1Ab. La unión al mismo receptor en este tipo de ensayos de competencia, se ha visto en otros insectos, en *M. sexta*, *Chilo suppressalis* y *Sciropophaga incertulas* se ha demostrado que la subclase Cry1A (Aa, Ab y Ac) comparten el mismo sitio de unión.²⁹ Situación similar se encuentra en *P. xylostella* para Cry1Ac y Cry1F,¹³ en *H. virescens* Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac comparte un mismo receptor, pero además Cry1Ab y Cry1Ac compiten por un segundo sitio de unión y Cry1Ac tiene un receptor adicional a los anteriores.³⁰

Este complejo sistema de reconocimiento y unión a receptores no es exclusivo de estos insectos y con estas toxinas, hasta el momento no es posible establecer un patrón común de unión para las toxinas de la subclase 1A.

Considerando el alto grado de identidad y homología (82-90%) entre las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac,³¹ se podría suponer que actúan a través de un receptor común y tendrían un modo de acción idéntico. Sin embargo en *M. sexta*, Cry1Aa y Cry1Ab reconocen a una glicoproteína de 210 kDa y Cry1Ac al menos a dos poblaciones de receptores una de 210 kDa (caderina) y otra de 85-120 kDa (aminopeptidasa).³

Nosotros encontramos que las tres toxinas se unen a un mismo receptor de ca. 106 kDa, que presenta actividad de aminopeptidasa N terminal (dato no mostrado).

En general, el modo de acción de las proteínas Cry a nivel molecular, como es el reconocimiento de la toxina y la unión al receptor no es del todo clara, por lo que la caracterización de los recepto-

res es un paso importante en la elucidación de este mecanismo. Asimismo, hemos señalado la importancia de realizar bioensayos y determinar la susceptibilidad de cierta plaga para un número determinado de toxinas, ya que el origen tanto de la toxina, como de la plaga pueden influir en los resultados.

Es claro que el uso más racional y efectivo de los bioinsecticidas dependerá, en gran medida, del conocimiento básico del modo de acción para, de esta manera, seleccionar y/o generar toxinas más efectivas contra las plagas y más seguras para el humano y medio ambiente.

Resumen

En este trabajo probamos la toxicidad y especificidad de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* clase Cry1 (LC_{50} = ng/cm²) hacia *Trichoplusia ni*. Las proteínas más tóxicas fueron Cry1Ac, 1Ab y 1Ca (LC_{50} = 1.1, 3.4 y 12.2), seguidas de Cry1Ja y 1Fa (LC_{50} = 87.4 y 248.8). El resto fueron no tóxicas. Las toxinas Cry1Aa, 1Ab y 1Ac se unen a una proteína de ca. 106 kDa. Los valores de Kd, fueron de 1.9 y 1.2 nM; Rt 0.59 y 0.54 pM toxina/mg vesículas, para Cry1Ab y 1Ac, respectivamente. Los ensayos de competencia demostraron que Cry1Ac y 1Ab comparten el mismo receptor.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, *Trichoplusia ni*, Cry1Ab, Cry1Ac, Receptor.

Abstract

Toxicity and specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins class (LC_{50} = ng/cm²) were tested against *Trichoplusia ni*. The proteins Cry1Ac, Cry1Ab and Cry1Ca were highly toxic (LC_{50} = 1.1, 3.4 and 12.2), followed by Cry1Ja and 1Fa (LC_{50} = 87.4 and 248.8). These other toxins were nontoxic. Toxins Cry1Aa, 1Ab and 1Ac bind to a protein of ca. 106 kDa. The Kd of Cry1Ab and Cry1Ac for the binding site were 1.9 and 1.2 nM, respectively. The mean binding-site concentrations were 0.59 for Cry1Ab and 0.54 pmol/mg of vesicle protein for Cry1Ac. Competition experiments indicated that Cry1Ab and Cry1Ac share the same affinity-binding site.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Trichoplusia ni*, Cry1Ab, Cry1Ac, Receptor.

Referencias

1. Aronson, A. L., W. Beckman & P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50:1-24.
2. Feitelson, J. S., J. Payne & L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* 10:271-275.
3. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler & D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
4. Peyronnet, O., V. Vachon, R. Brosseau, D. Baines, J-L. Schwartz & R. Laprade. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1679-1684.
5. Knowles, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* 24:275-308.
6. Gould, F., A. Martínez-Ramírez, A. Anderson, J. Ferré, F. J. Silva & W. J. Moar. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:7986-7990.
7. Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele & J. Van Rie. 1993. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1828-1837.
8. Estada, U. & J. Ferré. 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3840-3846.
9. Wolfersberger, M. G. 1990. Toxicity of two *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites of midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* 46:475-477.
10. Luo, K., D. Banks & M. J. Adang. 1999. Toxicity, binding, and permeability analysis of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:457-464.
11. Ballester, V., F. Granero, B. Tabashnik, T. Malvar & J. Ferré. 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1413-1419.
12. Ferré, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Jansens & M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* biopesticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:51191-5123.
13. Granero, F., V. Ballester & J. Ferré. 1996. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 224:779-783.
14. McGaughey, W. H. & D. E. Johnson. 1994. Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strain on cross-resistance in Indian-meal moths (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 80:535-540.
15. Tabashnik, B., N. Finson, M. W. Johnson & D. G. Heckel. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4627-4629.
16. Stewart, G. S. A., K. Johnstone, E. Hagelberg & D. J. Ellar. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochem. J.* 198:101-106.
17. Iracheta-Cárdenas, M.M. 1999. Toxicidad de la clase Cry1 de *Bacillus thuringiensis* y su unión a receptores en *Trichoplusia ni*. Tesis Doctoral. FCB/UANL.
18. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
19. Finney, D. J. 1962. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge.
20. Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele & H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186:239-247.
21. Wolfersberger, M., P. Luetny, A. Maurer, P. Parenti, F. V. Sacchi, B. Giordana & G. M.

- Hanoztt. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86:301-308.
22. Munson, P. & D. Rodbard. 1980. *LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems*. *Anal. Biochem.* 107:220-239.
23. Ellar, D. J. 1997. The structure and function of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins and prospects for biopesticide improvement. British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68. Surrey. U.K.
24. Höfte, H. & H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
25. Van Frankenhuisen, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*, p. 1-35. *In Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and practice*. P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, and S. Higgs (Ed.). John Wiley & Sons LTD. England.
26. Wu, D. & A. I. Aronson. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* 267:2311-2317.
27. Moar, W. J., L. Masson, R. Brousseau & J. T. Trumble. 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2480-2483.
28. Milne, R. E., A. S. D. Pang & H. Kaplan. 1995. A protein complex from *Choristeneura fumiferana* gut-juice involved in the precipitation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 25:1101-1114.
29. Lee, M. K. & D. H. Dean. 1996. Inconsistencies in determining *Bacillus thuringiensis* toxin binding sites relationship by comparing competition assays with ligand blotting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 575-580.
30. Oddou, P., H. Hartmann & M. Geiser. 1991. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 202:673-680.
31. Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Fitelson, E. Schepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum & D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.