

Identificación funcional de tres nuevos genes involucrados a resistencia a *B. thuringiensis* en *Plutella* spp

Autores principales

Lianet Rodríguez Cabrera, Ivis Morán Bertot, Camilo Ayra Pardo.

Otros autores

Pilar Téllez Rodríguez, Daily Hernández Hernández, Claudia Rodríguez de la Noval, Milagros Ponce Castillo, Jose Angel Silva Guirado.

Colaboradores

Regla Caridad Estrada Vázquez, Omar Gell Cuesta, Aymee Orquin Fernández, Ivón Menéndez Valdez, Ada Abad Perez, Ariel Cruz Jiménez, Sergio Cruz Castillo.

Entidad ejecutora

División de Plantas. Laboratorio Biotecnología Ambiental. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). BioCubaFarma.

Autor para correspondencia

Investigador Titular, Dr. Camilo Ayra Pardo

Lab. Biotecnología Ambiental. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Ave 31 entre 158 y 190 Cubanacán, Playa. Apartado Postal 6162. C. Habana 10600, Cuba.

Fax: 7273 1779

Teléfono: 7250 4370

E. mail: camilo.ayra@cigb.edu.cu

Resumen

La explotación amplia y sostenida del entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* (Bt) en el control de insectos plagas y vectores de enfermedades está amenazada por la evolución de resistencia. En el presente trabajo, se combinaron la construcción de genotecas substractivas y el análisis de función génica mediante ARN interferente (ARNi), para determinar las bases moleculares de la resistencia al bio-insecticida Dipel en la población KarUK6 del insecto modelo *Plutella xylostella*. Dipel es el producto comercial más difundido de su tipo a escala mundial, utilizado para el control de diferentes insectos plagas por estar basado en una mezcla de esporas y toxinas insecticidas de Bt subespecie *kurstaki* cepa HD1 (Btk-HD1), con un espectro de acción amplio. Como contraparte, se utilizó una población susceptible a Dipel, genéticamente similar a KarUK6. El análisis ontológico de las genotecas substractivas mostró una multitud de procesos biológicos alterados en la cepa resistente; mientras, el análisis de

la expresión génica en presencia de Dipel evidenció la naturaleza pre-inducida de la respuesta transcripcional en la cepa KarUK6. Por su regulación, se destacaron tres genes – SDF2L1, CDKAL1 y HEL-1 – los dos primeros nunca antes descritos en invertebrados, cuyos ortólogos en vertebrados son claves para regular la homeostasis celular ante diferentes tipos de estrés. El silenciamiento génico vía ARNi de los tres genes suprimió la resistencia a Dipel en las larvas de KarUK6, demostrando que estos genes o los mecanismos celulares en que participan, son cruciales para la resistencia. Entre los resultados novedosos de este trabajo se encuentran: 1) primera publicación de genes diferencialmente expresados en una población de *P. xylostella* resistente a Dipel (Btk-HD1), 2) primera descripción en un invertebrado de los ortólogos de SDF2L1 y CDKAL1, dos genes claves de la respuesta celular al estrés, y 3) la demostración funcional vía ARNi de la importancia de tres nuevos genes de *P. xylostella* para la resistencia al insecticida Dipel. El conocimiento adquirido tiene como importancia práctica fundamental que nos muestra tres nuevos genes del insecto que pudieran ser “blanco” de estrategias dirigidas a minimizar el riesgo de resistencia a un producto comercial basado en *B. thuringiensis* y consecuentemente, lograr incrementar su efectividad. El trabajo cuenta con una publicación en la prestigiosa revista *Insect Molecular Biology*, de la Sociedad Real Entomológica, presentaciones en congresos nacionales e internacionales y avales de personalidades reconocidas en la temática.

Comunicación corta

Introducción

Las bases moleculares de la resistencia a los insecticidas basados en *B. thuringiensis* no han sido aún del todo dilucidadas. El mecanismo de resistencia más difundido está relacionado con la pérdida de unión de las toxinas de Bt a sus receptores en el intestino del insecto. Sin embargo, la multitud de factores genéticos de respuesta al estrés biótico identificados en la defensa celular a la intoxicación por Bt, indica la complejidad de esta interacción huésped-patógeno. El insecticida Dipel de Btk HD1 es el producto comercial basado en *B. thuringiensis* más exitoso y difundido a escala mundial y está compuesto por una mezcla de esporas y cristales proteicos insecticidas, donde coexisten 5 tipos diferentes de toxinas con actividad frente a lepidópteros plagas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A y Cry2B. Aun así, existen informes en la literatura de evolución de insecto-resistencia a Dipel. En el presente trabajo nos dimos a la tarea de caracterizar molecularmente la resistencia a Dipel en una cepa de la polilla dorso de diamante *Plutella xylostella*, una plaga cosmopolita y a su vez un insecto modelo para el estudio de los mecanismos de resistencia a los insecticidas por su elevada capacidad de adaptación a los mismos. En el estudio se emplearon metodologías de la

genómica funcional como la hibridación sustractiva por supresión y el silenciamiento posttranscripcional vía ARN interferente (ARNi). El análisis cinético de la expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real. En los bioensayos, la relación dosis-respuesta se infirió con el paquete estadístico probit. Para el análisis de mortalidad en los experimentos de ARNi se utilizó un modelo lineal generalizado y la función logit link.

Desarrollo

La cepa 'Karak' de *P. xylostella*, que evolucionó hacia la resistencia a Dipel en condiciones de campo tras varios años de exposición al insecticida, se cruzó con la cepa Lab-UK (susceptible a Dipel), y la descendencia sometida a seis ciclos de retrocruces con Lab-UK, seleccionando con Dipel cada generación. De esta forma se obtuvo la cepa KarUK6, aproximadamente 23 veces más resistente a Dipel que su isólinea genética Lab-UK (Fig. 1).

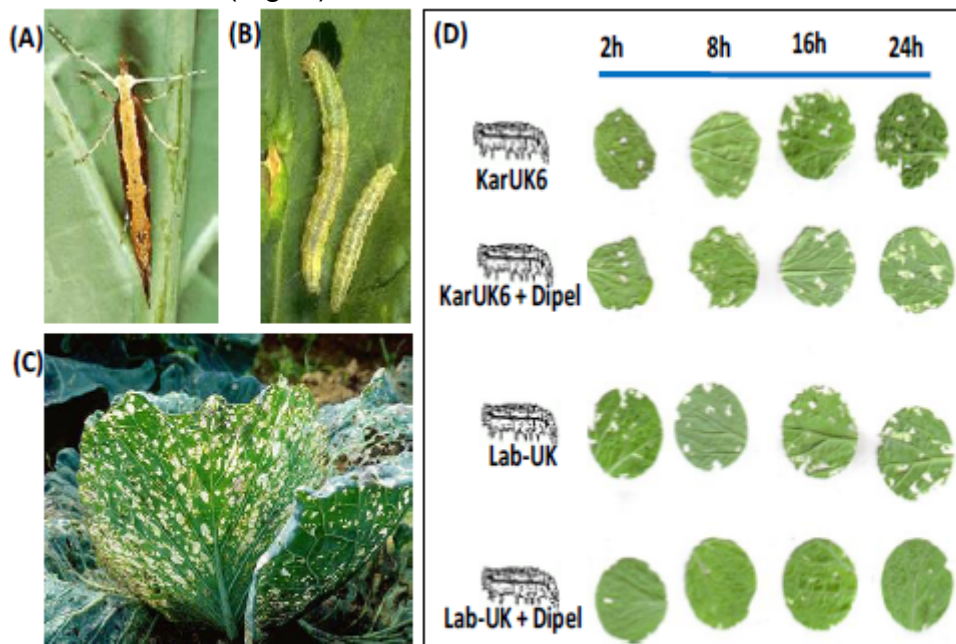


Figura 1. *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). (A) Estado adulto, (B) estado larval, (C) plantas afectadas por larvas de *P. xylostella*, (D) Exposición a Dipel de larvas de las cepas KarUK6 (resistente) y Lab-UK (susceptible).

La determinación de la concentración letal media de Dipel (LC50) o concentración que causa muerte en el 50% de la población, determinada en bioensayos con larvas de ambas cepas de *P. xylostella*, arrojó para KarUK6 una LC50=93.1 ppm y límites de confianza 95% de 60.3–144, respecto a Lab-UK con LC50=3.97 ppm y límites de confianza 95% de 1.10–14.3.

Un total de 134 fragmentos de ADN complementario (ADNc), pertenecientes a genes del intestino larval de KarUK6 expresados diferencialmente en presencia de Dipel respecto a Lab-UK, fueron clonados en las hibridaciones sustractivas. El análisis ontológico distribuyó las secuencias entre cinco categorías funcionales diferentes. Los genes involucrados en la síntesis y el plegamiento de las proteínas (18%) y la respuesta al estrés oxidativo (17%) fueron los más representados en las genotecas

sustractivas, mientras que los genes relacionados con procesos de la matriz extracelular conformaron el grupo más pequeño (7%). La abundancia de secuencias de genes involucrados en el metabolismo de lípidos (14%) y transporte/energía (11%) fue intermedia. El 33% restante correspondió a secuencias con función desconocida. Las secuencias fueron depositadas en la base de datos GenBank (Núm. Acc. HO652045 – HO652175 y HO663508) y corresponden al primer informe de secuencias de genes con expresión diferencial frente al insecticida Dipel en un lepidóptero resistente.

Doce secuencias entre aquellas que mostraron una identidad altamente significativa (valor $E < 10^{-4}$) fueron seleccionadas en representación de cada categoría funcional para el análisis de la cinética de expresión génica en la respuesta a Dipel. En todos los casos, excepto para una secuencia con homología a chaperonina, la expresión génica basal fue significativamente superior en las larvas resistentes respecto a las susceptibles (Fig. 2).

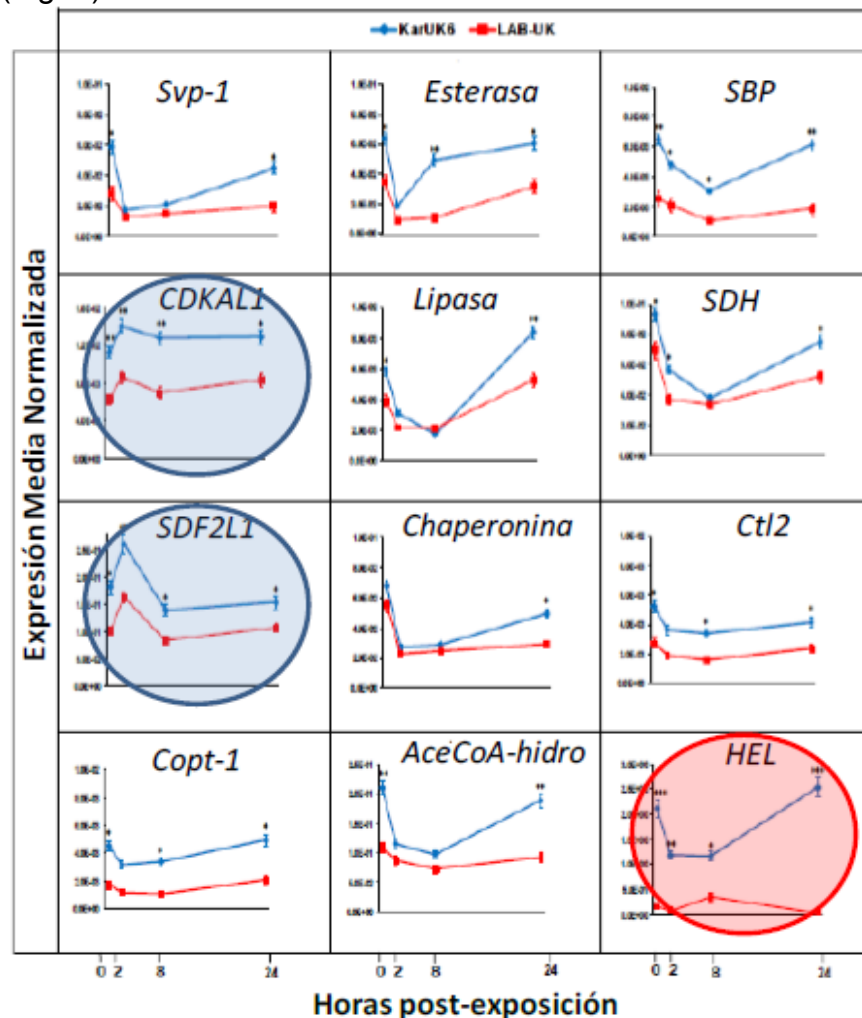


Figura 2. Cinética de la regulación en respuesta a Dipel, determinada por qRT-PCR, de 12 genes representativos de las genotecas sustractivas. Enmarcados en un círculo azul los dos genes con respuesta temprana a Dipel (SDF2L1 y CDKAL1) y en un círculo rojo (HEL), el que muestra la mayor expresión en la cepa KarUK6 respecto a Lab-UK. Los tres fueron clonados vía RACE (GenBank núm. acc. **HQ199330**, **HQ199329** y **HQ199327**) y su función en la respuesta a Dipel investigada vía ARNi.

Lo anterior es novedoso y evidencia que la respuesta molecular a Dipel esta preferentemente pre-inducida en la cepa resistente de *P. xylostella*. La cinética de expresión de los 12 genes durante las primeras 24 horas de intoxicación mostró a tres con una regulación atractiva por su inducción temprana (SDF2L1 y CDKAL1) o por mostrar la mayor diferencia en los niveles de expresión entre KarUK6 y Lab-UK (HEL-1) (Fig. 2), lo que nos hizo plantearnos la hipótesis de un posible rol de estos genes en la resistencia a Dipel en *P. xylostella*. A continuación, la secuencia completa de ADNc de cada uno de estos tres genes de *P. xylostella* fue clonada mediante el procedimiento RACE (del inglés, 'rapid amplification of sDNA ends') y enviada al GenBank. Las secuencias mostraron tamaños de 1707, 1111 y 983 pares de bases para PxCDKAL1 (Núm. Acc. HQ199330), PxSDF2L1 (Núm. Acc. HQ199329) y PxHEL-1 (Núm. Acc. HQ199327), respectivamente. La predicción de la función y de los dominios estructurales mediante el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) combinado con el análisis de las relaciones filogenéticas, reveló características importantes acerca de la función molecular de cada uno de estos genes no descritos con antelación en *P. xylostella* (Ayra-Pardo y cols., 2015).

La determinación del rol de los genes PxCDKAL1, PxSDF2L1 y PxHEL-1 en la resistencia a Dipel de KarUK6, se llevó a cabo combinando el silenciamiento post-transcripcional de la expresión génica vía ARNi con bioensayos en insectos utilizando diferentes concentraciones de la formulación insecticida Dipel. Con tal propósito, se sintetizaron in vitro fragmentos de ARN doble cadena (ARNdc) correspondientes a cada gen y se administraron por vía oral a las larvas de tercer estadio. La eficacia del ARNi fue corroborada 24 horas después del tratamiento con ARNdc mediante qRT-PCR utilizando ARN total del intestino larval. La especificidad por la secuencia "blanco" del ARNi fue validada mediante la administración de ARNdc no específico del gen de la enzima β -D-glucuronidasa (Gus) de *Escherichia coli*, que no causó ninguna alteración en los niveles de transcritos de los tres genes seleccionados.

La figura 3 muestra los resultados de los bioensayos de exposición a Dipel con insectos tratados para el ARNi de PxSDF2L1, PxCDKAL1 y PxHEL-1. Respecto a las larvas tratadas con ARNi específico, la administración de ARNdc incrementó significativamente la mortalidad de todos los insectos, tanto resistentes como susceptibles, con afectación en la expresión de PxSDF2L1 y PxCDKAL1.

En el caso de PxHEL-1, un incremento significativo en la mortalidad de las larvas tratadas con el ARNi fue detectado exclusivamente para la cepa KarUK6. No se observaron diferencias en las tasas de mortalidad larval entre los grupos controles alimentados con solución tampón o que contenían el ARNdc-Gus inespecífico ($F_{4,21}=1.63$, $p=0.20$), lo que indica que la interacción con moléculas de ARNdc per se no afecta la respuesta a Dipel. Igualmente, se verificó con los grupos controles que el tratamiento ARNi no afectó la formación de pupas y emergencia de los adultos. Estos resultados son novedosos ya que se informa por vez primera sobre la participación de los genes PxSDF2L1, PxCDKAL1 y PxHEL-1 en la resistencia al insecticida Dipel en la cepa KarUK6 de *P. xylostella*.

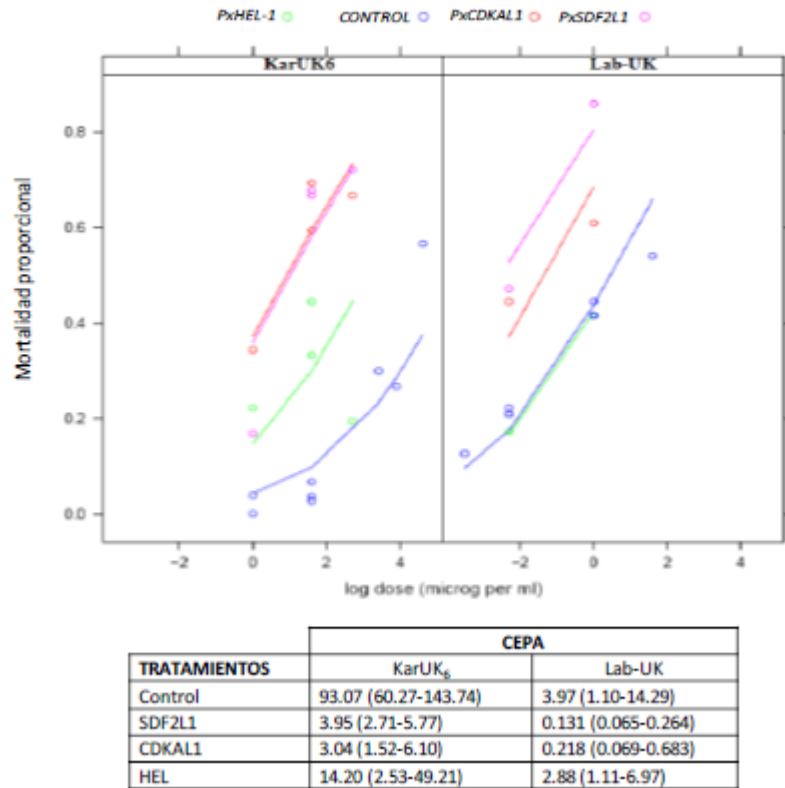


Figura 3. Resultado de los bioensayos con KarUK6 y Lab-UK luego de los tratamientos ARNi. Los datos se tomaron en bioensayos de 5 días de duración; las líneas son el resultado de modelos estadísticos ajustados. El grupo control es la unión del tratamiento con ARN doble cadena inespecífico y el tratado con solución tampón. La tabla muestra los valores de LC50 (límites de confianza 95%) calculados en el *probit* para cada relación dosis/respuesta.

CONCLUSIONES

En resumen, nuestros resultados muestran una conexión entre la resistencia a Dipel y la sobreexpresión constitutiva en KarUK6 de tres nuevos genes de *P. xylostella*, que codifican para los homólogos de la metil-tiotransferasa CDKAL1, la co-chaperona SDF2L1 y la metaloproteína HEL-1, nombrados aquí PxCDKAL1, PxSDF2L1 y PxHEL-1, respectivamente. La supresión de la expresión de estos genes en el intestino de *P. xylostella* afectó en todos los casos la habilidad de las larvas de sobrevivir la ingestión del patógeno. La diversidad de genes con expresión diferencial en el intestino de KarUK6 implica que una variedad de procesos celulares están involucrados en el mantenimiento de la resistencia, aunque los genes seleccionados en este estudio para los análisis de función corresponden a factores determinantes de la homeostasis celular en otras patologías. Por ejemplo, CDKAL1 es importante para asegurar la calidad de la proinsulina en las células del páncrea en la respuesta de inmunidad innata en *Arabidopsis thaliana* contra el ataque de bacterias, al asistir en el plegamiento correcto de los receptores-quinasa tipo 'LRR' en el retículo endoplasmático. La metaloproteasa HEL-1 pertenece a la familia de las astacinas, que se han asociado con la formación de la matriz extracelular y la reparación de las heridas. De esta forma, los tres nuevos genes para *P. xylostella* descritos en este estudio se unen a la multitud de factores cuya expresión cambia en

los insectos resistentes y se ven directamente involucrados en determinar la susceptibilidad del huésped a *B. thuringiensis*.

Bibliografía

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Arragain, S., Handelman, S.K., Forouhar, F., Wei, F.Y., Tomizawa, K., Hunt, J. F., Douki, T., Fontecave, M., Mulliez, E. and Atta, M. (2010) Identification of eukaryotic and prokaryotic methyltransferases for biosynthesis of 2-methylthio-N6-threonylcarbamoyladenine in tRNA. *J. Biol. Chem.* 285: 28425–28433.
- Atsumi, S., Miyamoto, K., Yamamoto, K., Narukawa, J., Kawai, S., Sezutsu, H., Kobayashi, I., Uchino, K., Tamura, T., Mita, K., et al. (2012) Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: E1591-8.
- Baxter, S.W., Badenes-Pérez, F.R., Morrison, A., Vogel, H., Crickmore, N., Kain, W., Wang, P., Heckel, D.G. and Jiggins C.D. (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera. *Genetics* 189: 675-679.
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A. (2010) The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 58–63.
- Cancino-Rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J.I., Lanz-Mendoza, H., Encarnación, S., Evans, A.E., Gill, S.S., Soberón, M., Jurat-Fuentes, J.L. and Bravo, A. (2012) Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One* 7: e37034.
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., and Bulla, L.A. Jr. (2003) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Mol. Cell Proteomics* 2: 19-28.
- Contreras, E., Rausell, C. and Real, M.D. (2013) Proteome response of *Tribolium castaneum* larvae to *Bacillus thuringiensis* toxin producing strains. *PLoS One* 8: e55330.
- Diatchenko, L., Chris, Y., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., et al. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025–6030.
- Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., Santos, A.C. et al. (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Prot.* 64: 150–158.

- Fukuda, S., Sumii, M., Masuda, Y., Takahashi, M., Koike, N., Teishima, J., Yasumoto, H., Itamoto, T., Asahara, T., Dohi, K. and Kamiya, K. (2001) Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress-inducible gene and encodes a new member of the Pmt/rt protein family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 407–414.
- Gahan, L.J., Gould, F. and Heckel, D.G. (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293: 857–860.
- Gahan, L.J., Pauchet, Y., Vogel, H. and Heckel, D.G. (2010) An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet.* 6: e1001248.
- Gong Y, Wang C, Yang Y, Wu S, Wu Y. (2010) Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China. *J Invertebr Pathol.* 104: 90-6.
- Grumbling, G., Strelets, V. and The FlyBase Consortium. (2006) FlyBase: anatomical data, images and queries. *Nucleic Acids Res.* 34: D484–D488.
- Guo, Z., Cheng Zhu, Y., Huang, F., Luttrell, R. and Leonard, R. (2012) Microarray analysis of global gene regulation in the Cry1Ab-resistant and Cry1Ab-susceptible strains of *Diatraea saccharalis*. *Pest Manag. Sci.* 68: 718-30.
- Guo, Z., Kang, S., Chen, D., Wu, Q., Wang, S., Xie, W., et al. (2015) MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. *PLoS Genet.* 11(4): e1005124.
- Guo, Z., Kang, S., Zhu, X., Xia, J., Wu, Q., Wang, S., et al. (2015b) Downregulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 59: 30–40.
- Heckel, D.G. (2012) Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pest. Biochem. Physiol.* 104: 103-110.
- Heckel, D.G., Gahan, L.J., Baxter, S.W., Zhao, J.Z., Shelton, A.M., et al. (2007) The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 95: 192–197.
- Hernández-Martínez, P., Hernández-Rodríguez, C.S., Krishnan, V., Crickmore, N., Escriche, B. and Ferré, J. (2012) Lack of Cry1Fa binding to the midgut brush border membrane in a resistant colony of *Plutella xylostella* moths with a mutation in the ABCC2 locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6759-61.
- Hernández-Martínez, P., Hernández-Rodríguez, C.S., Krishnan, V., Crickmore, N., Escriche, B. and Ferré, J. (2012) Lack of Cry1Fa binding to the midgut brush border membrane in a resistant colony of *Plutella xylostella* moths with a mutation in the ABCC2 locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6759-61.

- Hernández-Martínez, P., Navarro-Cerrillo, G., Caccia, S., de Maagd, R.A., Moar, W. J., Ferré, J., Escriche, B. and Herrero, S. (2010) Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. *PLoS One* 5: e12795.
- Herrero, S., Ansems, M., Van Oers, M.M., Vlak, J.M., Bakker, P.L. and de Maagd, R.A. (2007) REPAT, a new family of proteins induced by bacterial toxins and baculovirus infection in *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 1109–1118.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P.L., Moar, W.J. and de Maagd, R.A. (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6: 96.
- James, C. (2013) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA Brief No. 46. ISAAA: Ithaca, NY.
- Janmaat, A.F. and Myers, J. (2003) Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. R. Soc. London, Ser. B—Biol. Sci.* 270: 2263–2270.
- Kao, C.Y., Los, F.C., Huffman, D.L., Wachi, S., Kloft, N., Husmann, M., Karabrahimi, V., Schwartz, J.L., Bellier, A., Ha, C., et al. (2011) Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS Pathog.* 7: e1001314.
- Kruger, M., Van Rensburg, J.R.J. and Van Den Berg, J. (2011) Resistance to Bt Maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa. *Ecol. Entomol.* 40: 477-483.
- Lei, Y., Zhu, X., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., Guo, Z., Xu, B., Li, X., Zhou, X. and Zhang, Y. (2014) Midgut transcriptome response to a Cry toxin in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Gene* 533: 180-7.
- Lu, F.H., Tang, S.M., Shen, X.J., Wang, N., Zhao, Q.L., Zhang, G.Z. and Guo, X.J. (2010) Molecular cloning and characterization of hatching enzyme-like gene in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep.* 37: 1175–1182.
- McGaughey, W.H. (1985) Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193–195.
- McGaughey, W.H. and Johnson, D.E. (1994) Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strains on cross resistance in Indianmeal moths (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol* 87: 535–540.
- Meunier, L., Préfontaine, G., Van Munster, M., Brousseau, R. and Masson, L. (2006) Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Mol. Biol.* 15: 475-83.
- Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T. and Hendershot, L.M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4456–4469.

- Möhrlen, F., Maniura, M., Plickert, P., Frohme, M. and Franka, U. (2006) Evolution of astacin-like metalloproteases in animals and their function in development. *Evol. Dev.* 8: 223–231.
- Mott, J. and Werb, Z. (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 558–64.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., and Dobbie, Z. (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32: 1372–1380.
- Navarro-Cerrillo, G., Hernández-Martínez, P., Vogel, H., Ferré, J. and Herrero, S. (2013) A new gene superfamily of pathogen-response (repat) genes in Lepidoptera: classification and expression analysis. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 164: 10-17.
- Nekrasov, V., Li, J., Batoux, M., Roux, M., Chu, Z.H., Lacombe, S., Rougon, A., Bittel, P., Kiss-Papp, M., Chinchilla, D., et al. (2009) Control of the pattern recognition receptor EFR by an ER protein complex in plant immunity. *EMBO J* 28: 3428–3438.
- Park, Y., González-Martínez, R.M., Navarro-Cerrillo, G., Chakroun, M., Kim, Y., Ziarsolo, P., Blanca, J., Cañizares, J., Ferré, J. and Herrero, S. (2014) ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biol.* 12: 46.
- Pascual, L., Jakubowska, A.K., Blanca, J.M., Cañizares, J., Ferré, J., Gloeckner, G., Vogel, H. and Herrero, S. (2012) The transcriptome of *Spodoptera exigua* larvae exposed to different types of microbes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42: 557-70.
- Potvin, L., Laprade, R. and Schwartz, J.L. (1998) Cry1ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from intracellular stores in Cf1 cells (*Choristoneura fumiferana*, Lepidoptera). *J. Exp. Biol.* 201: 1851-1858.
- R Development Core Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0. Available online at <http://www.R-project.org/>.
- Raymond, B., Sayyed, A.H. and Wright, D.J. (2007) Host plant and population determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Biol. Lett.* 3: 82–85.
- Raymond, B., Wright, D.J. and Bonsall, M.B. (2011) Effects of host plant and genetic background on the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Heredity* 106: 281-288.
- Rodríguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borrás-Hidalgo, O., Wright, D.J. and Ayra-Pardo, C. (2010) RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environ. Microbiol.* 12: 2894-903.

- Sayyed, A.H. and Wright, D.J. (2001) Cross-resistance and inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth (*Plutella xylostella* L) from lowland Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 57: 413–421.
- Sayyed, A.H., Raymond, B., Ibiza-Palacios, M.S., Escriche, B. and Wright, D.J. (2004) Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7010–7017.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., et al. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775–806.
- Schott, A., Ravaud, S., Keller, S., Radzimanowski, J., Viotti, C., Hillmer, S., Sinning, and Strahl, S. (2010) Arabidopsis stromal-derived factor 2 (sdf2) is a crucial target of the unfolded protein response in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 285: 18113-18121.
- Storer, N.P., Babcock, J.M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G.D., et al. (2010) Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J. Econ. Entomol.* 103: 1031–1038.
- Tabashnik B. (1997) Insect resistance to Bt revisited. *Nat Biotechnol.* 15: 1324. Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N. and Johnson, M.W. (1990) Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Tanaka, S., Miyamoto, K., Noda, H., Jurat-Fuentes, J.L., Yoshizawa, Y., Endo, H. and Sato, R. (2013) The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS J.* 280: 1782-1794.
- Tiewisiri, K. and Wang, P. (2011) Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 14037-42.
- Turner, C.T., Davy, M.W., MacDiarmid, R.M., Plummer, K.M., Birch, N.P. and Newcomb, R.D. (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.* 15: 383–391.
- Valaitis, A.P. (2008) *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 611–618.
- van Munster, M., Préfontaine, G., Meunier, L., Elias, M., Mazza, A., Brousseau, R. and Masson, L. (2007) Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect Mol. Biol.* 16: 25-35.
- Wang, P., Zhao, J. Z., Rodrigo-Simón, A., Kain, W., Janmaat, A.F., Shelton, A. M., Ferré, J. and Myers, J. (2007) Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a

greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1199-207.

Wei, F.Y., Suzuki, T., Watanabe, S., Kimura, S., Kaitsuka, T., Fujimura, A., Matsui, H., Atta, M., Michiue, H., Fontecave, M., et al. (2011) Deficit of tRNA^{Lys} modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. *J. Clin. Invest.* 121: 3598-608.

Yang, Y., Zhu, Y. C., Ottea, J., Husseneder, C., Leonard, B.R., Abel, C. and Huang, F. (2010) Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and –resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 592-603.

Yao, J., Buschman, L.L., Lu, N., Khajuria, C. and Zhu, K.Y. (2014) Changes in gene expression in the larval gut of *Ostrinia nubilalis* in response to *Bacillus thuringiensis* Cry1ab protoxin ingestion. *Toxins* 6: 1274-94.

Zhang, K. and Kaufman, R.J. (2006) Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. In: Starke, Br. K. & Gaestel, M. (eds.). *Molecular chaperones in health and diseases. Handb. Exp. Pharmacol.* 172, pp 69-