

## RESEÑA BIBLIOGRÁFICA

### BACILLUS THURINGIENSIS: LEGADO PARA EL SIGLO XXI

### BACILLUS THURINGIENSIS: THE LEGACY TO THE XXI CENTURY

Realpe<sup>1</sup> M, Montoya<sup>2</sup> D, Orduz<sup>3</sup> S.

#### RESUMEN

Los insecticidas basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis* son el principal renglón productivo del mercado mundial de biopesticidas. La investigación dedicada a esta área, promovida por la urgente necesidad de resolver problemas agrícolas y de salud pública, ha dado lugar a un conocimiento exhaustivo de su biología. La diversidad de cepas diferentes de *B. thuringiensis* ha permitido desarrollar productos principalmente, pero no exclusivamente, para el control de insectos. Con los nuevos desarrollos de la biología molecular, se ha logrado comprender su mecanismo de acción a nivel molecular y también se ha logrado extender sus capacidades entomopatógenas. Como producto de su amplio uso en muchos países, se han presentado casos de resistencia en poblaciones de insectos susceptibles. Con esta revisión se pretende elaborar un contexto teórico del estado actual de la investigación sobre *B. thuringiensis*, describiendo brevemente el conocimiento sobre esta bacteria, haciendo hincapié en los fenómenos biológicos que subyacen su actividad tóxica y la problemática que se avecina en el próximo siglo con los fenómenos de resistencia cada vez más comunes, todo esto analizado desde una perspectiva biotecnológica.

**Palabras Claves:** Biopesticidas, control biológico, endotoxinas, resistencia, *Bacillus thuringiensis*.

#### SUMMARY

*Bacillus thuringiensis*-based insecticides are the main production line of the biopesticides world market. The research devoted to this area, promoted by the necessity to solve problems in agriculture and public health has resulted in an

exhaustive knowledge of its biology. The diversity of the *B. thuringiensis* strains has permitted to develop several products mainly, but not exclusively, for insect control. With the new developments in the field of molecular biology, it has been possible to understand the molecular basis of the mode of action and to increase the range of activity as well. As a result of the broad use in several countries, resistant strains of some of the susceptible insects have appeared. The aim of this review is to elaborate a theoretical framework of the current state of research on *B. thuringiensis*, describing briefly the knowledge on this bacterium, with emphasis on biological phenomena that underlie its toxic activity and the problems that will be faced during the XXI century with the increasingly common resistance, all this analyzed from a biotechnological perspective.

**Keywords:** Biopesticides, biological control, endotoxins, resistance, *Bacillus thuringiensis*.

#### DESARROLLO DE BACILLUS THURINGIENSIS COMO BIOPESTICIDA

Desde que el círculo de Roma formuló las predicciones ecológicas sobre el desarrollo de las civilizaciones humanas en un ambiente limitado, la humanidad prestó especial atención al refinamiento de sus esquemas productivos de tal forma que fueran compatibles con la preservación de nuestro medio natural. La biotecnología y los microorganismos como *Bacillus thuringiensis*

<sup>1</sup> Biólogo, Investigador Unidad de Biotecnología y Control Biológico

<sup>2</sup> Biólogo, Investigador Unidad de Biotecnología y Control Biológico

<sup>3</sup> Biólogo, Ph.D. Jefe Unidad de Biotecnología y Control Biológico

constituyen una herramienta esencial en la planeación sana de estrategias para la producción de alimentos y para control de vectores de enfermedades.

*B. thuringiensis*, es una bacteria esporulada, gram positiva, que produce inclusiones cristalinas al momento de la esporulación (figura 1). Estas inclusiones estan compuestas de proteínas, y algunas de ellas son tóxicas cuando las ingieren organismos susceptibles. Esta bacteria ha sido aislada de los cinco continentes, a partir de habitats variados, desde epizootias en desiertos hasta la tundra, de muestras de tierra, alimento para animales y hojas de plantas (Goldberg y Margalit, 1978; Martin y Travers, 1989; Meadows et al., 1992; Orduz et al., 1992; Smith y Couche, 1991), y se constituye en el

microorganismo más importante para el control de insectos a nivel mundial.

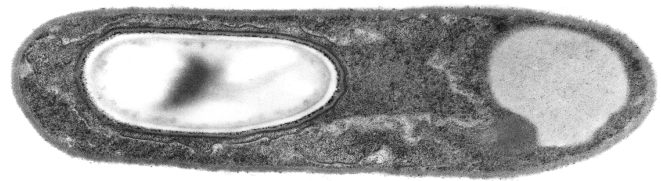


Figura 1. Célula esporulada de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* mostrando la espora (izquierda) y el cristal parasporal (derecha). (Fotografía suministrada por los Drs. A. Delécluse y J.F. Charles, Instituto Pasteur, Paris).

Tabla 1. Clasificación de cepas *Bacillus thuringiensis* por serotipos y designación de la subespecie correspondiente (Datos del catálogo de cepas del Centro Internacional de *Bacillus Entomopatógenos*, Instituto Pasteur, Paris, Francia).

Antígeno H	Serovar/subespecie	Abreviatura	Antígeno H	Serova/subespecie	Abreviatura
1	thuringiensis	THU	24a,24b	neoleonensis	NEO
2	finitimus	FIN	24a,24c	novosibirsk	NOV
3a,3c	alesti	ALE	25	coreanensis	COR
3a,3b,3c	kurstaki	KUR	26	silo	SIL
3a,3d	sumiyoshiensis	SUM	27	mexicanensis	MEX
3a,3d,3e	fukuokaensis	FUK	28a,28b	monterrey	MON
4a,4b	sotto	SOT	28a,28c	jegathesan	JEG
4a,4c	kenyae	KEN	29	amagiensis	AMA
5a,5b	galleriae	GAL	30	medellin	MED
5a,5c	canadiensis	CAN	31	toguchini	TOG
6	entomocidus	ENT	32	cameroun	CAM
7	aizawai	AIZ	33	leesis	LEE
8a,8b	morrisoni	MOR	34	konkukian	KON
8a,8c	ostrinae	OST	35	seoulensis	SEO
8b,8d	nigeriensis	NIG	36	malaysiensis	MAL
9	tolworthi	TOL	37	andaluciensis	AND
10a,10b	darmstadiensis	DAR	38	oswaldocruzi	OSW
10a,10c	londrina	LON	39	brasiliensis	BRA
11a,11b	toumanoffi	TOU	40	huazhongensis	HUA
11a,11c	kyushuensis	KYU	41	sooncheon	SOO
12	thompsoni	THO	42	jinghongiensis	JIN
13	pakistani	PAK	43	guiyangiensis	GUI
14	israelensis	ISR	44	higo	HIG
15	dakota	DAK	45	roskildiensis	ROS
16	indiana	IND	46	champaisis	CHA
17	tohokuensis	TOH	47	wratislaviensis	WRA
18a,18b	kumamotoensis	KUM	48	balearica	BAL
18a,18c	yosoo	YOS	49	muju	MUJ
19	tochigiensis	TOC	50	navariensis	NAV
20a,20b	yunnanensis	YUN	51	xiaquanensis	XIA
20a,20c	pondicheriensis	PON	52	kim	KIM
21	colmeri	COL	53	asturiensis	AST
22	shandongiensis	SHA	54	poloniensis	POL
23	iaponensis	JAP	55	palmayolensis	PAL

Junto con *B. mycooides* y *B. anthracis*, *B. thuringiensis* pertenece al grupo de *B. cereus*. Estas especies, en conjunto con *B. megaterium*, están clasificadas en el grupo 1 del género *Bacillus*, y pueden ser diferenciadas entre sí por pocos atributos: *B. thuringiensis* por su toxicidad para invertebrados (los genes de las toxinas están localizados en plásmidos), *B. anthracis* por su patogenicidad hacia vertebrados (los genes de las toxinas están localizados en plásmidos), y *B. mycooides* por su crecimiento rizoide en medio sólido. De este grupo, *B. cereus* y *B. anthracis* están considerados como patógenos para humanos (Damgaard, 1996).

Desde el descubrimiento de *B. thuringiensis* por Ishiwata en Japón en 1901 y su descripción formal por Berliner en Alemania, (1911, 1915), el interés en esta bacteria es cada día mayor; hasta la fecha se han descrito 68 subespecies de acuerdo a su antígeno flagelar (tabla 1), con un rango estrecho de organismos blanco, fundamentalmente en la clase Insecta (Lepidoptera, Díptera, Coleoptera, Mallophaga, y Orthoptera). Sin embargo, algunos reportes recientes han descrito cepas activas contra otros organismos como nemátodos, algunos protozoos y ácaros (Bone, 1989, Chilcott y Wigley, 1993, Feitelson et al., 1992, Levot, 1995, Narva et al., 1991, Payne et al., 1991a, 1991b).

Como resultado de la búsqueda de esta bacteria en todo el mundo, se han establecido diferentes colecciones de importancia en Brasil, Colombia, Estados Unidos, Francia, Inglaterra, Israel, México, Rusia y Uzbekistán. Estas colecciones contienen cepas que han sido aisladas de diferentes tipos de materiales colectados en más de 50 países. El catálogo de la colección de cepas del Instituto Pasteur es uno de los más representativos a nivel mundial, y en él existen varias subespecies que contienen cientos de cepas; sin embargo, la mayoría de las subespecies contienen solo unas pocas. Seis subespecies de *B. thuringiensis* que representan solamente el 10.9%, contienen aproximadamente el 62% de las cepas depositadas en esa colección. De las 68 subespecies reportadas en ese catálogo, el 18.2% contiene solamente la cepa de referencia, lo que representa solamente el 0.36% del total. Otras colecciones existentes en empresas privadas, no están disponibles para su estudio y análisis.

#### **Uso de *Bacillus thuringiensis* en el control de insectos.**

El uso de *B. thuringiensis* para el control de insectos fue iniciado en los años 30, para el control del barrenador europeo del maíz *Ostrinia nubilalis*. El primer producto comercial estuvo disponible en Francia en 1938 bajo el nombre de Sporeine y desde entonces se desarrolló una producción masiva en varios países como la República Checa, Francia, Alemania y la ex-USSR. En Estados Unidos, el primer producto comercial estuvo disponible solo en 1957, bajo el nombre de Thuricide. En estos y muchos otros casos posteriores, las diferentes cepas

usadas de país en país y la falta de uniformidad en los productos desarrollados, incidió en la variabilidad y falta de reproducibilidad de los resultados iniciales para el control de plagas (van Frankenhuyzen, 1993).

El panorama de los productos basados en *B. thuringiensis* se expandió tras el descubrimiento de la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* subespecie *kurstaki* por Dulmage (1970). Además de la adopción de un sistema estandarizado para calibrar la potencia de las diferentes preparaciones, el establecimiento de las unidades tóxicas internacionales permitió la comparación de los diferentes productos desarrollados. Hace 25 años, cuando su producción y uso mundial fueron reiniciados, el mercado estaba dominado por productos basados en la cepa HD-1, y básicamente dirigido al control de insectos lepidópteros en plantaciones forestales. En 1986 el volumen de ventas era de 50 millones de dólares, lo cual representó menos del 1% del mercado mundial de insecticidas (Baldwin, 1987). En 1993 el mercado de biopesticidas, del cual *B. thuringiensis* representa el 98%, era del 6%. Debido a las restricciones inherentes al uso de insecticidas químicos, la creciente resistencia de los insectos, al alto costo de desarrollo de nuevos productos químicos y la eficacia de los biopesticidas, se espera que el mercado de productos basados en *B. thuringiensis*, tenga un crecimiento anual entre el 10 y 15% en los próximos 10 años (Menn, 1996).

De Europa oriental, China y la ex-URSS, no existen estimativos sobre el costo involucrado en el uso de este tipo de biopesticida; sin embargo, se sabe que la producción anual en China es cercana a las 1.200 toneladas, y se calcula que el área tratada con *B. thuringiensis* constituye aproximadamente 1 millón de hectáreas (Salama y Morris, 1993). Se ha estimado que en Canadá, el 60% de los cultivos forestales tratados se realiza con productos basados en *B. thuringiensis* (van Frankenhuyzen, 1993). El programa para el control de la transmisión de ceguera de río de la Organización Mundial de la Salud en África utilizó 750.000 litros de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, en un área de 18.000 kilómetros del río Níger para controlar el vector *Simulium damnosum* (Becker y Margalit, 1993).

El éxito comercial de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* para el control de plagas agrícolas, el descubrimiento de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* en los años 70 y *B. thuringiensis* subesp. *morrisoni*, patovarietades *tenebrionis* y San Diego en los años 80, disparó definitivamente el interés industrial en esta bacteria (tabla 2). La tecnología del ADN recombinante y otros descubrimientos genéticos recientes, han ampliado las posibilidades para el desarrollo de bacterias y plantas recombinantes con propiedades insecticidas. Los esfuerzos conjuntos de los gobiernos, universidades y la industria, han permitido explotar las excelentes propiedades insecticidas de esta bacteria, lo cual ha generado un espectacular crecimiento en los últimos 10 años.

Tabla 2. Desarrollo del interés industrial en *Bacillus thuringiensis* antes y después de 1980<sup>a</sup>.

Compañía	Cepas nativas	Cepas mejoradas	Cultivos resistentes	Liberación mediada por bacterias
<b>Antes de 1980</b>				
Abbott	*			
Biochem	*			
Duphar	*			
Zoecon	*			
<b>Después de 1980</b>				
Abbott	*1	*		
Agracetus			*	
Agrigenetics				*
Calgene			*	
Compañías Chinas	?			
Ciba Geigy	*5	*		
Crop Genetics Intl.				*
Industria Biotech Cuba	?			
Dow Elanco	*	*		
Ecogen	*7	*7		
Egipto	?			
ICI	*6	*	*	
Laverlam	*9			
Monsanto			*	*
Mycogen	*8	*8		*
Novo	*4	*		
Plant Genetic System			*	
Rohm and Haas			*	
Solvay/Duphar	*2	*		
Sumitomo	*	*		
Sungene Techn. Inc.			*	
Zoecon/Sandoz	*3	*	*	
Productos registrados basados en:				
<i>Bt kurstaki</i>	<i>Bt israelensis</i>		<i>Bt tenebrionis</i>	
1. Dipel	Vectobac			
2. Bactospeine, Futura, Florbac	Bactimos			
3. Thuricide, Javelin	Teknar		Trident	
4. Foray, Biobit	Skeetal		Novodor	
5. Agree				
6. Biodart				
7. Cutlass, Condor, Foil, Agree Foil, Agree, Raven			Foil, Agree	
8. MVP, Match			M-One. Mtrack	
9. Thurilav				

<sup>a</sup> Tomado de Van Frankenhuyzen, 1993 y Sanchis et al., 1996.

## DETERMINANTES MOLECULARES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *B. THURINGIENSIS*.

### Toxinas producidas por *B. thuringiensis*

El hallazgo más relevante, en lo que se relaciona con las posibilidades de uso de *B. thuringiensis*, lo constituyó en buena medida la naturaleza química de sus toxinas. La actividad biológica radica, fundamentalmente, en la producción de proteínas tóxicas conocidas como  $\delta$ -endotoxinas, que exhiben características muy particulares como son su alto nivel de expresión, su deposición intracelular en forma de una inclusión parasporal

cristalina, su alta especificidad hacia el organismo blanco y la baja residualidad ambiental debida a su naturaleza bioquímica (van Frankenhuyzen, 1993). El carácter protéico de las toxinas permite que estas sean estudiadas genéticamente con diversas finalidades.

La biosíntesis de las toxinas está profundamente regulada durante el ciclo de vida de *B. thuringiensis*, el cual puede ser dividido en cuatro fases de acuerdo al patrón de expresión de sus genes; una fase previa de aclimatación metabólica durante la cual germinan las esporas y las células expresan enzimas extracelulares, una segunda

etapa de crecimiento exponencial en la que ocurre la proliferación máxima y se expresan una serie de exotoxinas, un estado de transición de la fase vegetativa a la fase de esporulación como respuesta a la detección del agotamiento de nutrientes durante el cual cambia el patrón de expresión de genes para afrontar el medio adverso (en esta etapa se inicia la síntesis de las  $\delta$ -endotoxinas) y finalmente, la fase de esporulación que representa un fenómeno de diferenciación terminal, en la que llega a su máximo nivel la expresión de  $\delta$ -endotoxinas (Agaisse y Lereclus, 1995; Aronson, 1993; Lereclus, 1988).

Las  $\delta$ -endotoxinas se sintetizan en gran cantidad durante el estado de transición y todo el proceso de esporulación, llegando a constituir el 30 % del peso seco de las células (Agaisse y Lereclus, 1996). Por cristalizar intracelularmente, se les ha denominado proteínas Cry y los genes que las codifican se designan como genes *Cry*. Además, existe otro tipo de  $\delta$ -endotoxinas denominadas proteínas Cyt que son mosquitocidas y tienen actividad hemolítica; cuando se presentan (usualmente asociadas a cepas con actividad contra dípteros), son depositadas conjuntamente con las proteínas Cry en la inclusión parasporal (Höfte y Whiteley, 1989; Whiteley y Schnepf, 1986).

Algunas  $\delta$ -endotoxinas son 300 veces más potentes que los piretroides y 80.000 veces más tóxicas que los organofosforados (Feitelson et al., 1992). La morfología y la composición protéica de los cristales parasporales difiere entre las cepas de *B. thuringiensis* y depende de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento utilizadas. Las inclusiones parasporales contienen varias  $\delta$ -endotoxinas que se asocian formando un complejo cristalino, a través de interacciones débiles como fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas fuertes, y uniones covalentes como puentes disulfuro intra e intermoleculares (Burgues y Hurst, 1977).

Además, durante el ciclo vegetativo, *B. thuringiensis* produce exotoxinas solubles de varios tipos (Damgaard, 1996); algunos investigadores han propuesto que ellas sean consideradas factores de virulencia adicionales a las  $\delta$ -endotoxinas lo que explicaría la alta patogenicidad de esta bacteria hacia sus organismos blanco (Ellar, 1996; Federici y Johnson, 1996; Lereclus, 1996; Salamitou et al., 1996).

Algunos de estos factores de virulencia alternativos incluyen:

- $\alpha$ -Exotoxinas (Hemolisina I y II, y Thuringiolisina), proteínas citolíticas inespecíficas de 29-47 kDa.

- $\beta$ -Exotoxinas (Thuringiensinas), análogos nucleotídicos del ATP y UTP que son sintetizadas por enzimas cuyos genes se encuentran en plásmidos conjugativos, compiten por las RNA-polimerasas y así bloquean la

síntesis de rRNA en mamíferos; al inhibir la transcripción, ejercen actividad mutagénica (Carlberg et al., 1995). Son usadas para el control de mosca doméstica en África (Ohba et al., 1981).

-Fosfolipasas, proteínas citotóxicas de dos tipos, una específica para hidrolizar fosfatidil-colina y otra para fosfatidil-inositol.

-Enterotoxina, proteína citotóxica semejante a la encontrada en *B. cereus* (40 kDa).

-Thuricina (péptido antibacteriano), bacteriocina semejante a la cereina de *B. cereus* y a la megacina de *B. megaterium*, está codificada en un plásmido de 150 MDa.

También se ha encontrado recientemente, que algunas cepas de *B. thuringiensis* producen otro tipo de toxinas denominadas VIP (Vegetative Insect Protein), las cuales se expresan durante la fase vegetativa de crecimiento y exhiben toxicidad superior a algunas  $\delta$ -endotoxinas (Estruch et al., 1996). Sin embargo, actualmente se considera a las  $\delta$ -endotoxinas como el principal factor de virulencia de *B. thuringiensis*.

Algunas cepas producen  $\delta$ -endotoxinas activas solo contra lepidópteros, dípteros ó coleópteros; sin embargo, se han reportado cepas que producen toxinas que tienen actividad (actividad contra lepidópteros y dípteros, o lepidópteros y coleópteros). Actualmente, la diferenciación entre  $\delta$ -endotoxinas hace uso de sus secuencias aminoacídicas, deducidas a su vez de la secuencia de los genes que las codifican; de esta manera se tienen 26 clases que agrupan el centenar de secuencias hasta ahora descritas (tabla 3). Las secuencias completas de cada uno los genes que codifican las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* están disponibles en GenBank.

### Mecanismo de acción de las $\delta$ -endotoxinas

El uso de un biopesticida exige conocer la forma como este realiza su acción mediante la caracterización del proceso que sigue desde el contacto con su organismo blanco hasta su muerte, analizando detenidamente el grado de especificidad que exhiba. Las  $\delta$ -endotoxinas se sintetizan como protoxinas y algunas de ellas están relacionadas estructuralmente (figura 2); son modificadas post-traduccionalmente mediante la adición de residuos glúcidos y formación de puentes disulfuro que dan lugar a un patrón regular (celda cristalina), el cual permite el crecimiento posterior del cristal que compone la inclusión parasporal (Schnepf, 1995). También se ha encontrado que *B. thuringiensis* produce proteínas semejantes a chaperonas moleculares para asistir el proceso de cristalización de las  $\delta$ -endotoxinas; estas proteínas tienen pesos cercanos a 20 kDa y los genes que las codifican se encuentran asociados a los genes *cry* o *cyt* (figura 3).

Tabla 3. Nomenclatura de las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* y número de acceso en geneBank del gen correspondiente (Crickmore, 1995).

Actual	Anterior	GeneBank	Actual	Anterior	GeneBank
Crv1Aa1	CrvIA(a)	M11250	Crv3Aa3	CrvIIIA	Y00420
Crv1Ab1	CrvIA(b)	M13898	Crv3Aa3	CrvIIIA	M30503
Crv1Ac1	CrvIA(c)	M11068	Crv3Aa3	CrvIIIA	M37207
Crv1Ac2	CrvIA(c)	M35524	Crv3Aa3	CrvIIIA	U10985
Crv1Ac3	CrvIA(c)	X54159	Crv3Ba1	CrvIIIB	X17123
Crv1Ac4	CrvIA(c)	M73249	Crv3Ba2	CrvIIIB	A07234
Crv1Ac5	CrvIA(c)	M73248	Crv3Bb1	CrvIIIBb	M89794
Crv1Ac6	CrvIA(c)	U43606	Crv3Bb2	CrvIIIC(b)	U31633
Crv1Ad1	CrvIA(d)	M73250	Crv3Ca1	CrvED	XS9797
Crv1Ae1	CrvIA(e)	M65252	Crv4Aa1	CrvIVA	Y00423
Crv1Ba1	CrvIB	X06711	Crv4Aa2	CrvIVA	D00248
Crv1Ba2		X95704	Crv4Ba1	CrvIVB	X07423
Crv1Bb1	ET5	L32020	Crv4Ba2	CrvIVB	X07082
Crv1Bc1	CrvIB(c)	Z46442	Crv4Ba3	CrvIVB	M20242
Crv1Ca1	CrvIC	X07518	Crv4Ba4	CrvIVB	D00247
Crv1Ca2	CrvIC	X13620	Crv5Aa1	CrvVA(a)	L07025
Crv1Ca3	CrvIC	M73251	Crv5Ab1	CrvVA(b)	L07026
Crv1Ca4	CrvIC	A27642	Crv5Ba1		U19725
Crv1Ca5	CrvIC	X96682	Crv6Aa1	CrvVIA	L07022
Crv1Ca6	CrvIC	X96683	Crv6Ba1	CrvVIB	L07024
Crv1Ca7	CrvIC	X96684	Crv7Aa1	CrvIIIC	M64478
Crv1Cb1	CrvIC(b)	M97880	Crv7Ab1	CrvIIICb	U04367
Crv1Da1	CrvID	X54160	Crv7Ab2	CrvIIICc	U04368
Crv1Db1	PrB	Z22511	Crv8Aa1	CrvIIIE	U04364
Crv1Ea1	CrvIE	X53985	Crv8Ba1	CrvIIIG	U04365
Crv1Ea2	CrvIE	X56144	Crv8Ca1	CrvIIIF	U04366
Crv1Ea3	CrvIE	M73252	Crv9Aa1	CrvIG	X58120
Crv1Eb1	CrvIE(b)	M73253	Crv9Aa2	CrvIG	X58534
Crv1Fa1	CrvIF	M63897	Crv9Ba1	CrvIX	X75019
Crv1Fa2	CrvIF	M73254	Crv9Ca1	CrvIH	Z37527
Crv1Fb1	PrD	Z22512	Crv9Da1	N141	D85560
Crv1Ga1	PrA	Z22510	Crv10Aa1	CrvIVC	M12662
Crv1Gb1	CrvH2		Crv11Aa1	CrvIVD	M31737
Crv1Ha1	PrC	Z22513	Crv11Ba1	Jeq80	X86902
Crv1Hb1		U35780	Crv11Bb1	MED94	
Crv1Ia1	CrvV	X62821	Crv12Aa1	CrvVB	L07027
Crv1Ia2	CrvV	M98544	Crv13Aa1	CrvVC	L07023
Crv1Ia3	CrvV	L36338	Crv14Aa1	CrvVD	U13955
Crv1Ia4	CrvV	L49391	Crv15Aa1	34kDa	M76442
Crv1Ia5	CrvV	Y08920	Crv16Aa1	cbm71	X94146
Crv1Ib1	CrvV	U07642	Crv17Aa1	cbm72	
Crv1Ja1	ET4	L32019	Crv18Aa1	CrvBP1	X99049
Crv1Jb1	ET1	U31527	Crv19Aa1	ieq65	Y07603
Crv1Ka1		U28801	Cvt1Aa1	CvtA	X03182
Crv1La1	CrvE1		Cvt1Ab1	CvtM	X98793
Crv2Aa1	CrvIIA	M31738	Cvt1Ba1		U37196
Crv2Aa2	CrvIIA	M23723	Cvt2Aa1	CvtB	Z14147
Crv2Aa3		D86064	40 kDa		M76442
Crv2Ab1	CrvEB	M23724	CrvC35		X92691
Crv2Ac1	CrvIIC	X57252	CrvC35		X98616
Crv3Aa1	CrvIIIA	M22472	Vip3A(a)		L48811
Crv3Aa2	CrvIIIA	J02978	Vip3A(b)		L48812

La actividad tóxica de *B. thuringiensis* sólo es posible si los cristales parasporales son ingeridos por un organismo susceptible. La especificidad en este nivel se restringe, entonces, a aquellos organismos con un mínimo de características en su sistema de captación de alimentos (dimensiones de la cavidad bucal y tipo de hábitos alimenticios). Un segundo nivel de especificidad lo constituye la solubilización de los cristales bajo las condiciones fisicoquímicas específicas del intestino medio de las larvas del organismo susceptible (pH alcalino usualmente y condiciones reductoras), de tal manera que se liberen las protoxinas en forma soluble. Posteriormente, las protoxinas solubles son reconocidas por enzimas digestivas que actúan sobre puntos

específicos de clivaje proteolítico liberando de esa manera los fragmentos tóxicos (figura 4). Esto representa un tercer nivel de especificidad, en este caso de carácter bioquímico. Las toxinas activadas se caracterizan por un patrón funcional de tres dominios (figura 5), cada uno de ellos cumple una función diferente a nivel molecular, incluyendo, la interacción con receptores celulares de las membranas vellosas del intestino medio, constituyendo así un cuarto nivel de especificidad (a nivel del reconocimiento molecular). Finalmente, ocurren cambios estructurales en las membranas que dan lugar a la formación de canales iónicos y a un desbalance osmótico generalizado en el intestino, lo que conlleva a la muerte del organismo susceptible (Ellar, 1996; Gill, 1995; Gill y Pietrantonio, 1995).

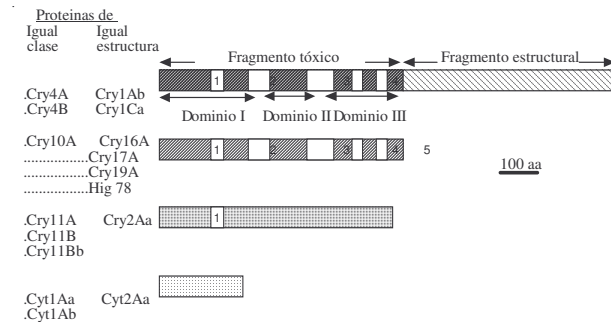


Figura 2. Semejanzas entre las toxinas de *B. thuringiensis* activas contra insectos. Los rectángulos blancos indican regiones conservadas (Tomado de Delécluse et al., 1996)

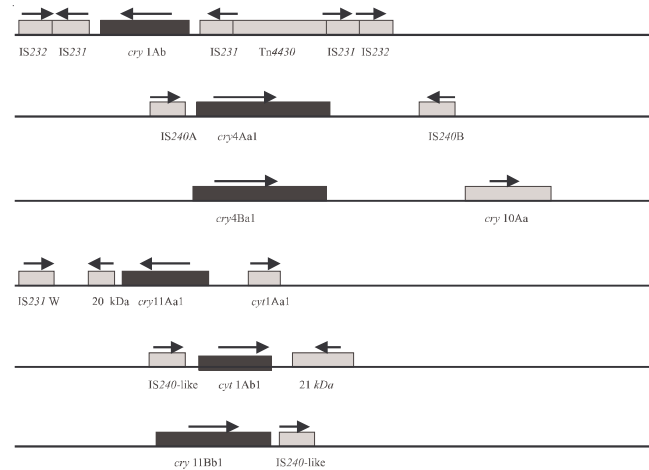


Figura 3. Ambiente genético alrededor de los genes *cry* de *B. thuringiensis*. Las flechas indican la dirección codificadora de su función; *cry1ab* codifica una toxina activa contra lepidópteros mientras que *cry4Aa1*, *cry4Ba1*, *cry11Aa1*, *cry11Bb1*, *cyt1Aa1* y *cyt1Ab1* codifican toxinas activas contra dípteros. *cry11Bb1* y *cyt1Ab1* pertenecen a *B. thuringiensis* subesp. *medellin*. Se indican igualmente los genes que codifican factores de cristalización (20 kDa y 21 kDa)



La alta selectividad de *B. thuringiensis* hacia su insecto blanco se puede entender, entonces, como producto del mecanismo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas, dado que involucra a la vez la estructura tridimensional del fragmento tóxico y factores inherentes al insecto (condiciones químicas especiales y un receptor específico). Además, se han observado casos singulares de sinergismo entre toxinas diferentes como el que se presenta en las cepas activas contra dípteros *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* y *B. thuringiensis* subesp. *medellin* (Angsuthanasombat et al., 1992; Orduz et al., 1996; Purcell y Ellar, 1996).

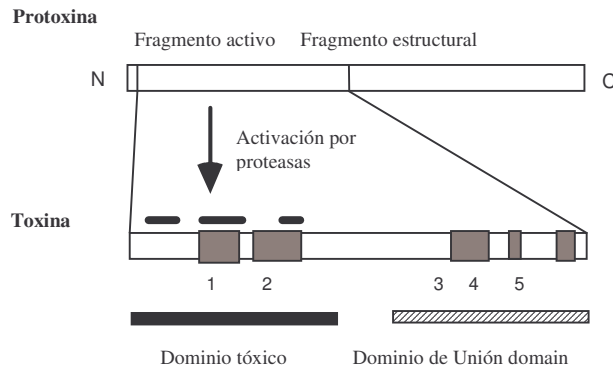


Figura 4. Esquema estructural de la proteína Cry1Ac1 de *B. thuringiensis*. La protoxina de 130 kDa es activada al perder la porción carboxilo terminal. La toxina así liberada posee 5 regiones conservadas (sombreadas) y es de naturaleza esencialmente hidrofóbica.

#### Genes que codifican las $\delta$ -endotoxinas

El estudio de la localización de los genes que codifican las  $\delta$ -endotoxinas permite tener una idea clara del ambiente en que están localizados los genes de *B. thuringiensis*, en lo que respecta a la regulación de su expresión y a su forma de dispersión entre distintas cepas. En esta bacteria se pueden encontrar plásmidos con pesos moleculares entre 1.4 y 180 MDa., su número de copias y tamaño depende de cada cepa aunque no existe relación alguna con el serotipo ó el patotipo al que pertenece (González et al., 1981); usualmente estos plásmidos son crípticos, excepto los que codifican factores de virulencia como las proteínas Cry cuya función se presume tiene valor adaptativo aunque su número de copias usualmente es muy bajo (Sanchis et al., 1988). Las  $\delta$ -endotoxinas producidas por *B. thuringiensis* son codificadas por genes localizados en plásmidos de 40 a 150 MDa (Agaisse y Lereclus, 1996; Lereclus et al., 1989; Whiteley y Schnepf 1986).

La organización estructural de los genes *cry* muestra un patrón de asociación con elementos genéticos móviles (secuencias relacionadas con eventos de transposición) lo que podría explicar la amplia diversidad de toxinas de este tipo (tabla 3); en algunos casos se han encontrado

genes incluidos completamente sobre transposones (Agaisse y Lereclus, 1996; Delécluse et al., 1989; Lereclus et al., 1984; Thiery et al., 1997). En general el ambiente genético que circunda los genes de las  $\delta$ -endotoxinas, se caracteriza por la presencia de secuencias de inserción aledañas, y en algunos casos, de transposones que pertenecen a la familia Tn3 de elementos genéticos móviles (Sherratt, 1989) (figura 3).



Figura 5. Representación tridimensional de la proteína Cry3Aa1 obtenida por cristalografía de rayos X. Se indican los dominios funcionales mencionados en el texto (Reproducido con autorización de D.J. Ellar, Li, et al., 1991. Nature 353:815-821).

Bajo condiciones de laboratorio, *B. thuringiensis* produce las toxinas Cry a razón de 0.5 mg/ml de cultivo (Agaisse y Lereclus, 1995); de acuerdo al tamaño de los cristales cada célula debe sintetizar entre  $1 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  moléculas (Du et al., 1994). Se ha considerado que esta bacteria sería económicamente muy costosa como biopesticida, de no ser por el alto nivel de expresión de los genes que codifican las  $\delta$ -endotoxinas (Baum y Malvar, 1995). No obstante, cuando se intenta clonar los genes *cry* en plásmidos de alto número de copias para sobreexpresarlos, es frecuente observar perturbaciones fisiológicas que se manifiestan en retrasos significativos del proceso de esporulación (Donovan et al., 1988; Realpe, 1997).

Se sabe que la mayoría de los genes *cry* dependen de la esporulación y se expresan desde el estado de transición (al final de la fase vegetativa) y alcanzan su nivel máximo de biosíntesis entre 4 y 8 horas después de iniciada la esporulación; esta expresión diferencial se logra a través de promotores específicos de esporulación (BTI y BTII reconocidos, respectivamente, por las subunidades  $\sigma^{35}$  y  $\sigma^{28}$  de la RNA polimerasa *B. thuringiensis*, homólogas a  $\sigma^E$  y  $\sigma^K$  de *B. subtilis*) (Agaisse y Lereclus, 1995). La razón por la cual *B. thuringiensis* acumula tal cantidad de  $\delta$ -endotoxinas en forma de cristales protéicos es difícil de discernir; sin embargo, el mecanismo molecular se está comenzando a dilucidar y se ha visto que involucra

fenómenos básicos de regulación en la expresión génica (promotores especiales, expresión concertada entre loci, estabilidad aumentada del mRNA, etc.), así como mecanismos postraduccionales y optimización del proceso de cristalización asistido por proteínas chaperonas con actividad foldasa. Estos fenómenos son independientes espacialmente pero están acoplados temporalmente a procesos de tal complejidad como la esporulación (Agaisse y Lereclus, 1995; Baum y Malvar, 1995; Whiteley y Schnepf, 1986).

### **Manipulación Genética de *Bacillus thuringiensis***

El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y el conocimiento que se ha estado adquiriendo sobre los genes *cry*, permitió manipularlos con el objetivo de mejorar las características de esta bacteria como agente de control biológico. Actualmente existen en el mercado algunos productos cuyos ingredientes activos son cepas mejoradas de *B. thuringiensis* (tabla 2); también se incluyen cepas de *Pseudomonas fluorescens* que expresan genes *cry*. Tales cepas aprovechan la eficiencia con la que se expresan los genes *cry* en su ambiente genético nativo ó características especiales de la bacteria huésped como su capacidad de colonizar la rizosfera en el caso de la última bacteria mencionada.

Con base en las características de expresión de los genes *cry*, se ha intentado producir las toxinas de *B. thuringiensis* en *Escherichia coli*; sin embargo el patrón de cristalización no es igual y la actividad tóxica se ve alterada de una u otra forma (Ge et al., 1990; Shimizu et al., 1992). De otro lado, mediante ingeniería genética, se han tratado de diseñar cepas de *B. thuringiensis* con combinaciones de genes diferentes haciendo uso de vectores de clonación bifuncionales o mediante transducción mediada por bacteriófagos específicos (Jannièrre et al., 1993; Lecadet et al., 1992). Estos enfoques han tenido resultados muy variables a raíz de la pobre caracterización de los sistemas de modificación/restricción y los elementos extracromosómicos en *B. thuringiensis*, lo cual se manifiesta en la inestabilidad estructural y segregacional de los plásmidos introducidos como fuera propuesto previamente (Crickmore et al., 1990). Las dificultades radican sobre todo, en la forma de regulación de los genes *cry*, puesto que hasta ahora solo se han encontrado en plásmidos de gran tamaño y de bajo número de copias; este tipo de plásmidos no se replica por el mecanismo usual de círculo rodante asimétrico (modelo de Cairns para colifagos filamentosos de banda simple) característico de los plásmidos de bacterias gram positivas, lo cual ha exigido el desarrollo de sofisticados vectores de clonación que portan los orígenes de replicación de plásmidos nativos de *B. thuringiensis* (Bron, 1990; Lereclus, 1988).

Otras estrategias para desarrollar cepas mejoradas de *B. thuringiensis*, se han dirigido a la obtención de mutantes

asporogénicos que permitirían ofrecer un producto libre de esporas y por ende, de los problemas asociados a la diseminación de una bacteria en hábitats nuevos ó el desarrollo de cepas con copias de los genes *cry* en su cromosoma para incrementar la estabilidad de los mismos (Cooper et al., 1996; Lereclus et al., 1995). Tales enfoques exigen considerable inversión de tiempo y esfuerzo; además, requieren del completo conocimiento del programa de expresión de los genes *cry* en la bacteria, por lo cual, hasta el momento, están restringidos a casos excepcionales como el gen que codifica la proteína Cry3Aa1 activa contra coleópteros; esta proteína se expresa principalmente en la fase estacionaria a partir de un promotor diferente a los usuales promotores dependientes de esporulación en *B. thuringiensis* (Agaisse et al., 1996).

De manera alternativa, se ha buscado expresar los genes en organismos no relacionados con *B. thuringiensis* para aprovechar alguna característica que permita optimizar la acción de las toxinas; tal es el caso de la transformación de virus asociados a insectos, bacterias del suelo para incrementar el efecto residual de las toxinas, plantas cultivadas para proteger todos los tejidos expuestos a plagas, y cianobacterias que hacen parte de la dieta de mosquitos, entre otros (Feitelson et al., 1992; Orduz et al., 1995; Schnepf, 1995; Thompson et al., 1995). Recientemente, se han modificado cepas de *B. thuringiensis* mediante fenómenos de recombinación específicos de sitio como sistema de transferencia de genes, gracias a la ubicuidad de los elementos de inserción que resultan muy útiles para dirigir eventos deseados de transposición. Los microorganismos desarrollados con esta metodología ya han comenzado a usarse en formulaciones comerciales (Baum et al., 1996; tabla 2).

En el caso de las cepas de *B. thuringiensis* activas contra dípteros, incluyendo aquellas usadas para el control de vectores de enfermedades tropicales, ellas exhiben varias limitaciones prácticas en su uso debido a la rápida sedimentación en el agua, sensibilidad a la radiación ultravioleta, y riesgo de desarrollo de resistencia en el insecto blanco. Existen diversos enfoques experimentales encaminados a solucionar estas limitaciones, entre los cuales se considera la manipulación de los genes determinantes de la toxicidad como una de las alternativas más llamativas (Porter et al., 1993; Porter, 1996). También se ha investigado la posibilidad de combinar características complementarias de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* y *B. sphaericus* transfiriendo, en uno u otro sentido, los genes responsables de la toxicidad mediante vectores bifuncionales y sistemas de recombinación homóloga (Poncet et al., 1996). Los resultados han sido muy variables en vista del somero conocimiento que se tiene de la genética molecular de estas bacterias (Agaisse y Lereclus, 1996).



Un logro importante lo constituyó la introducción de genes de *B. thuringiensis* en plantas de importancia económica (Gelernter y Schwab, 1993); tal iniciativa enfrentó problemas como lo sugiere la transferencia de un gen desde un organismo procarionte hasta un eucariote. La lista de plantas transformadas con estos genes aumenta

cada día (tabla 4) y en la mayoría de los casos, se han tenido que modificar los genes truncados a la usanza del código genético de las plantas para lograr alcanzar los niveles de expresión y actividad deseables y conferir, de esta manera, protección a las plantas contra el ataque de los insectos.

Tabla 4. **Especies de plantas que han sido modificadas genéticamente con genes de *Bacillus thuringiensis*.**

Grupo de cultivo		Insectos susceptibles
DICOTILEDONEAS		
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>	Lepidóptera
Coliflor	<i>Brassica juncea</i>	Lepidóptera, Coleóptera
Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Lepidóptera, Coleóptera
Melon	<i>Cucumis melo</i>	Lepidóptera, Coleóptera
Soya	<i>Glycine canescens</i>	Lepidóptera
Manzana	<i>Malus pumila</i>	Lepidóptera
Papaya	<i>Carica papaya</i>	Lepidóptera
Petunia	<i>Petunia hybrida</i>	Lepidóptera
Algodón	<i>Gossypium hirsutum</i>	Lepidóptera, Coleóptera
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	Lepidóptera
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	Lepidóptera
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Lepidóptera
Canola	<i>Brassica napus</i>	Lepidóptera
Menta	<i>Mentha citrata</i>	Lepidóptera
MONOCOTILEDONEAS		
Maiz	<i>Zea mays</i>	Lepidóptera, Coleóptera
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	Lepidóptera
Espárrago	<i>Asparagus officinalis</i>	Lepidóptera, Coleóptera

### RESISTENCIA DE INSECTOS A BIOPESTICIDAS BASADOS EN *BACILLUS THURINGIENSIS*

Ante el auge de la utilización de *B. thuringiensis* para el control de plagas agrícolas, durante un par de décadas se tenía previsto y se ha venido observando, la aparición de insectos resistentes a las toxinas de esta bacteria. Esto se refleja en la proliferación de estudios básicos bajo condiciones de laboratorio para evaluar la resistencia, los cuales se orientan a conocer sus posibles implicaciones y diseñar una estrategia de manejo adecuada (tabla 5). Si se considera que el desarrollo de plantas transgénicas con genes de *B. thuringiensis* tiene un gran potencial para el control de plagas de insectos en agricultura, hay que tener en cuenta que la resistencia de los insectos a éste tipo de materiales vegetales también puede presentarse.

El primer reporte de resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* involucró la polilla de los granos *Plodia interpunctella* bajo condiciones de almacenamiento de cosechas, y posteriormente se reportó en la polilla *Plutella*

*xylostella* en campo abierto (McGaughey, 1985; Tabashnik et al., 1990). En larvas de mosquito no se ha observado la resistencia en campo, solo ha podido ser demostrada para las toxinas de *B. sphaericus* (Rao et al., 1995, Regis et al., 1995).

Para tratar de entender este fenómeno de resistencia, es importante recordar las experiencias previas, relacionadas con insecticidas químicos como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y reguladores de crecimiento (Heckel, 1994). En términos generales, se debe considerar que:

1. Las poblaciones de insectos exhiben características que les permiten enfrentar cambios que inicialmente, amenazan su supervivencia.
2. Existen múltiples variantes fisiológicas que en determinadas circunstancias, pueden constituir mecanismos de resistencia y algunos de los individuos las portan inherentemente.
3. No existe garantía de que un método de control de insectos sea lo suficientemente efectivo para ser usado

sin riesgo de que conlleve al desarrollo de resistencia.  
4. Las características evolutivas de los insectos, su alta variabilidad genética, y las situaciones de control específicas hacen que algunas especies estén capacitadas para desarrollar resistencia.

El diseño exitoso de estrategias para el manejo de la resistencia de los insectos a las toxinas de *B. thuringiensis*, requiere conocer su naturaleza. Tres tipos de evidencia ilustran que los insectos desarrollan resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* en forma hereditaria:

Tabla 5. Algunos ejemplos de estudios en laboratorio para la inducción de resistencia en insectos a diferentes cepas de *B. thuringiensis*.

Especie	Subespecie de Bt o toxina	Número de generaciones	Sobrevivencia	Factor de resistencia	Referencia
<i>Heliothis virescens</i>	Cry1Ab1	14	34	16	Stone et al., 1989
<i>Spodoptera littoralis</i>	Bte	9	2-30	3.3	Sneh y Schuster, 1983
<i>Plodia interpunctella</i>	Btk	23	69	140	McGaughey y Johnson, 1992
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Btn	12	1.4	60	Whalon et al., 1993
<i>Aedes aegypti</i>	Bti	14	50	1.1	Goldman, et al., 1986
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Cry11Aa1	3		70	Gill et al., 1992
<i>Musca domestica</i>	Btt	25		6	Wilson y Burns, 1968

**Abreviaturas.** Bte, *B. thuringiensis* subespecie *entomocidus*; Btk, *B. thuringiensis* subespecie *kurstaki*; Bti, *B. thuringiensis* subespecie *israelensis*; Btn, *B. thuringiensis* subespecie *tenebrionis*; Btt, *B. thuringiensis* subespecie *thuringiensis*.

1. La comparación de las diferentes cepas de insectos resistentes, en la que se ha demostrado que la misma especie de insecto produce diferentes grados de resistencia, como en *P. interpunctella* (McGaughey, 1985, McGaughey y Johnson, 1987, McGaughey y Beeman, 1988) y en *Heliothis virescens* (Sims y Stone, 1991, Gould et al., 1992).

2. Los estudios de heredabilidad, donde cepas resistentes se han cruzados con cepas sensibles y los híbridos han sido cruzados o se han realizado cruces de prueba (retrocruces), y se ha demostrado que éste factor está ligado a un sólo locus (McGaughey y Beeman, 1988), o a varios (Sims y Stone, 1991).

3. Los estudios de ligamiento a marcadores genéticos, donde el genoma del organismo resistente es evaluado para buscar los genes de resistencia por medio de una correlación entre el gen de resistencia y alelos marcadores en la descendencia (Heckel et al., 1997).

### Mecanismos potenciales de resistencia

Mediante estudios de diversa índole, se pudo encontrar la causa de la resistencia a *B. thuringiensis* exhibida por *P. interpunctella* y en *P. xylostella*; en estos casos se observó que se trataba de una reducción en la afinidad de la toxina por su receptor (Bravo et al., 1992a, 1992b; Ferré et al., 1991; van Rie et al., 1990). Sin embargo, en el caso de *H. virescens*, esta pérdida de

afinidad por el receptor no ha podido relacionarse de manera clara con la resistencia (Gould et al., 1992; MacIntosh, et al., 1991). Debido a la naturaleza hereditaria de la resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis*, y a la disponibilidad de cepas de laboratorio de *H. virescens* resistentes a las toxinas, se ha esclarecido recientemente que la frecuencia inicial de los alelos responsables de la resistencia en poblaciones naturales de este insecto en los Estados Unidos debe ser  $1.5 \times 10^{-3}$  (Gould et al., 1997; Tabashnik, 1992). Así mismo, Heckel et al., (1997) después de estudiar marcadores genéticos en 10 de los 31 cromosomas de *H. virescens*, han podido establecer que el 80% del fenómeno de resistencia en esa especie, comparte un mismo grupo de ligamiento con el gen que codifica la manosa-6-fosfato-isomerasa. Tomando en consideración los muchos pasos que requiere la activación de las toxinas y el efecto tóxico hacia los insectos susceptibles, se piensa que también podrían existir otros mecanismos de resistencia (Knowles y Ellar, 1987, Gill et al., 1992).

Cuando se estudia la resistencia de poblaciones de insectos a toxinas de *B. thuringiensis* en condiciones de campo, normalmente se consideran varios niveles en los cuales puede ocurrir este fenómeno. En cada uno de estos niveles se pueden analizar cuatro factores:

1. El grado de protección que se obtiene contra la toxina primaria y por medio de la cual se controla de manera inicial, la intensidad de la presión de selección.
2. El grado de resistencia cruzada que se genera hacia otras toxinas y que tiene implicaciones en su uso dentro de los programas de control de insectos.
3. Las bases genéticas del mecanismo de resistencia, que tiene implicaciones en la heredabilidad de esta característica.
4. El costo de adaptación del mecanismo de resistencia, el cual podría estar en oposición a la selección de líneas resistentes.

**Los niveles en que se puede presentar resistencia son:**

*Comportamiento de alimentación.* Se ha demostrado que ciertos insectos pueden modificar sus hábitos alimenticios para evitar la ingestión de toxinas de *B. thuringiensis* (Gould et al., 1991); sin embargo, esto no puede generalizarse a todas las especies. Si la larva cambia sus preferencias debido a la presencia de toxinas en el alimento, debe buscar una nueva fuente de alimentación o de lo contrario, regular de manera efectiva la tasa de ingestión, con el consecuente retraso en el crecimiento. Este tipo de comportamiento puede resultar en un fenómeno de resistencia cruzada amplia y el costo asociado a esta adaptación, resulta indeterminado (Heckel, 1994).

*Solubilización.* La composición diferencial de los cristales producidos por diferentes cepas de *B. thuringiensis*, les confiere propiedades fisicoquímicas propias que, en algunos casos, podría resultar en insolubilidad y falta de toxicidad bajo las condiciones normales de pH del intestino de los insectos (Du et al., 1994). Aunque las condiciones fisiológicas del intestino medio de los insectos son ideales para la solubilización de los cristales nativos o los agregados de toxinas producidos por las plantas transgénicas, una falla en su solubilización podría contribuir a la resistencia (Aronson, et al., 1991, Aronson, 1995). Es poco probable que esto suceda y, entonces, el costo de adaptación sería muy alto, por que implicaría cambiar las propiedades fisicoquímicas del intestino medio, ante lo cual cambiarían también los hábitos alimenticios del insecto modificando su fisiología intestinal.

*Proteólisis deficiente de la protoxina.* Se ha demostrado que las enzimas proteolíticas del intestino de los insectos son necesarias en la generación de los fragmentos activos, y esta propiedad es de especial interés cuando se considera la toxina Cry2Aa1, cuya actividad contra lepidópteros o contra dípteros, depende del insecto que la procese, puesto que es diferente en cada caso. Por lo tanto, sería posible que un procesamiento proteolítico deficiente diera lugar a fragmentos atípicos no activos, como consecuencia de deficiencias en la composición

del jugo gástrico; ello tendría obvias implicaciones en la digestión de alimentos y por ende, su costo de adaptación sería alto.

*Excesiva proteólisis.* Si el procesamiento de la toxina fuera excesivo, podría llevar a la degradación completa de la toxina ó a un procesamiento atípico, con lo cual éstas se inactivarían. Este tipo de procesamiento tendría una alta probabilidad de generar resistencia cruzada a toxinas similares; además, este mecanismo tendría un costo de adaptación relativamente bajo, a menos que las variantes enzimáticas involucradas tengan actividad contra tejidos del insecto o contra proteínas de transporte, en cuyo caso el costo de adaptación podría ser muy alto.

*Inhibición por competencia.* La secreción de moléculas solubles del receptor que funcionen como cebo en el lumen intestinal podría bloquear las toxinas activadas. Este tipo de moléculas podría ser suficiente para evitar la acción de las toxinas sobre las células intestinales. Se ha demostrado que una aminopeptidasa N de *Manduca sexta* es el receptor de las toxinas de *B. thuringiensis*, y se encuentra unida a la membrana por medio del enlace glicosil-fosfatidil inositol; el rompimiento de este enlace podría generar formas solubles de este receptor (Knight et al., 1994, Yaoi et al., 1997). Por lo tanto, la activación de un mecanismo de esta clase podría contribuir al desarrollo de resistencia en los insectos. De la misma manera que la mayoría de los mecanismos de secuestro de insecticidas químicos, este resultaría ser muy costoso en términos energéticos, ya que para poder interceptar una molécula de toxina se requiere una molécula del receptor en forma soluble; además, se requiere igual número de las moléculas de receptor incrustadas en la membrana para desarrollar su función normal. Se esperaría que la probabilidad de resistencia cruzada hacia otras toxinas fuese relativamente baja si la afinidad por el receptor es muy alta, lo cual podría determinar un beneficio negativo entre la resistencia cruzada y el costo de adaptación.

*Cambios en la estructura primaria del blanco.* En la mayoría de los estudios sobre resistencia de los insectos a las toxinas de *B. thuringiensis*, se ha logrado demostrar una relación estrecha entre la unión de la toxina a los receptores y la mortalidad de los insectos (Van Rie et al., 1990, Ferré et al., 1991, MacIntosh et al., 1991, Gould et al., 1992, Tabashnik et al., 1994). Las sustituciones de aminoácidos en la estructura primaria del receptor pueden alterar su estructura tridimensional y por lo tanto, su afinidad por la toxina, lo cual podría derivar en un mecanismo de resistencia. Sin embargo, no existe evidencia directa de que este sea el caso en los trabajos reportados anteriormente. Así mismo, estos cambios también podrían interferir en el normal funcionamiento de la proteína de membrana que está sirviendo de receptor, por lo tanto, el costo del valor adaptativo de

esta estrategia sería intermedio. La probabilidad de desarrollar resistencia cruzada dependería, en gran medida, del tipo de cambio efectuado y de la similaridad entre la toxina seleccionante y las otras disponibles.

*Modificaciones secundarias del receptor.* La presencia de regiones glicosiladas en los receptores, representa un factor determinante en la unión de la toxina al receptor, por lo que es muy posible que un cambio en el patrón de glicosilación, reflejara un cambio en el patrón de susceptibilidad a la toxina en una especie de insecto. Este tipo de mecanismo puede conferir altos niveles de resistencia específica, pero bajos niveles de resistencia cruzada, y de nuevo, la falta de glicosilación podría interferir con algunas de las funciones normales de este tipo de molécula en la fisiología del intestino.

*Ausencia de poros.* Aunque la alta afinidad de la toxina por el receptor es un paso muy importante en la toxicidad, la formación del poro es un paso independiente y definitivo en la mortalidad del insecto. Las moléculas de las toxinas de *B. thuringiensis* sufren cambios conformacionales después de la activación y es posible que también lo tengan después de unirse al receptor para crear los poros transmembranales (Choma et al., 1991). Bloquear la acción de las toxinas a este nivel podría representar un mecanismo de resistencia muy efectivo, y debido a la naturaleza irreversible de la unión de la toxina al receptor, se evitaría la oportunidad de unión de otras moléculas de toxinas. Debido al poco conocimiento que se tiene de los mecanismos subsiguientes a la unión al receptor, es muy difícil establecer el costo adaptativo de este mecanismo.

### Manejo de la resistencia

El manejo de la resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* puede ser considerado como un caso especial del manejo de la resistencia a los insecticidas en general, pero hay que tener en consideración varios aspectos que hacen diferente a esta bacteria respecto a los insecticidas químicos (Tabashnik, 1994).

Se ha reportado ampliamente la poca actividad que tiene *B. thuringiensis* contra organismos no blanco; este hecho permite el mantenimiento de otros organismos como eventuales enemigos naturales de una plaga determinada que, al no ser controlados por las toxinas de *B. thuringiensis*, actuarían aditivamente con lo cual ayudarían a disminuir la aparición de la resistencia a este tipo de biopesticida (Tabashnik, 1986; Johnson y Gould, 1992). Por otro lado, cuando se hacen aplicaciones foliares de las toxinas de *B. thuringiensis*, estas son degradadas rápidamente por acción de la radiación ultravioleta, lo cual da un margen muy pequeño de residualidad. Esta baja residualidad es, probablemente, uno de los factores que minimizan la presión de selección, aunque el encapsulamiento de los nuevos productos

cuyo ingrediente activo son cepas transconjugantes (recombinantes) y la adición de bloqueadores de radiación ultravioleta a los productos formulados, podría extender su persistencia foliar.

Al mismo tiempo, el desarrollo de plantas transgénicas que expresan constitutivamente las toxinas de *B. thuringiensis* representa una amenaza muy clara, ya que favorecen el desarrollo de la resistencia en los insectos. Los monocultivos de variedades de plantas que expresen la toxinas de *B. thuringiensis* continuamente, son considerados como de alto riesgo para la selección de líneas resistentes debido a que las plagas están en contacto con las toxinas en todo momento, aún cuando tales insectos no estén causando daño económico. Como un método para reducir esta presión de selección, se propone diseñar plantas que regulan la expresión de las toxinas de manera espacial y temporal. Otras alternativas incluyen conectar la expresión de estas toxinas a promotores de señales de daño en las plantas o expresión específica en tejidos vulnerables o en cierto estado de desarrollo (Gould, 1988a; 1988b; Rafta, 1989). Otras estrategias diseñadas para afrontar el desarrollo de resistencia se mencionan a continuación:

*Mezcla de toxinas.* Otras estrategias para el manejo de esta resistencia, incluyen la posibilidad de utilizar mezclas de toxinas de manera simultánea con el propósito de retardar su aparición. Esta táctica se basa en el hecho de que la aparición de individuos resistentes es rara, y más aún, cuando se selecciona una población con una mezcla de compuestos, pero una condición esencial para que tal sistema pueda funcionar, es que las toxinas utilizadas no generen resistencia cruzada. Este ha sido uno de los problemas más importantes en la aparición de resistencia en lepidópteros a las toxinas tipo Cry1, donde algunas poblaciones de insectos han podido desarrollar resistencia a seis toxinas de *B. thuringiensis*; la razón fundamental de este fenómeno, es la estrecha relación evolutiva entre las toxinas Cry1. Por el contrario, la aparición de resistencia en mosquitos a las toxinas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, no se ha dado bajo condiciones de campo, ya que esta especie de bacteria produce 4 tipos diferentes de toxinas. El caso tal vez más claro para ilustrar este fenómeno, es la utilización de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* en programas tan intensivos como ha sido el control de *Simulium damnosum*, vector de ceguera de río en África donde hasta el momento, ni en éste programa ni en otros, se ha podido detectar la presencia de resistencia en los individuos tratados (Becker y Margalit, 1993).

Debido a que bajo condiciones de laboratorio, se ha podido inducir resistencia en *Culex quinquefasciatus* a mezclas de diferentes toxinas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* (figura 6), se ha recomendado ampliamente la búsqueda y desarrollo de nuevas cepas de importancia

para el control de mosquitos. De los programas desarrollados en varios países se ha podido establecer que existen dos cepas, *B. thuringiensis* subesp. *medellin* y *B. thuringiensis* subesp. *jegathesan*, con gran potencial para ser incorporadas en programas de control de mosquitos y que debido a que producen toxinas diferentes a las de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, podrían tener un impacto muy grande en retardar la aparición de resistencia (Orduz, 1997; Realpe, 1997; Restrepo et al., 1997).

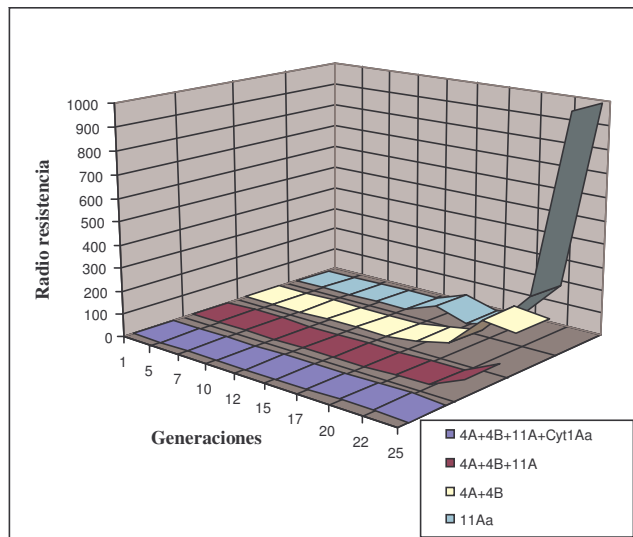


Figura 6. Niveles de resistencia de cepas de laboratorio de *Culex quinquefasciatus* seleccionadas con diferentes combinaciones de toxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Datos tomados de Georghiou and Wirth, 1997). La tasa de resistencia es la LC<sub>50</sub> de la línea de mosquito seleccionada/ LC<sub>50</sub> de la línea sin seleccionar). 4A, Cry4Aa; 4B, Cry4Ba1; 11Aa, Cry11Aa1; Cyt1Aa, Cyt1Ab1

**Sinergistas.** También ha sido propuesto el uso de sinergistas para aumentar la eficacia de las toxinas de *B. thuringiensis*, pero puede ser empleado, además, en el manejo de la resistencia en los insectos. Los inhibidores de enzimas como las serina-proteasas actúan de forma sinérgica con las toxinas de *B. thuringiensis* contra 5 especies de insectos. Además, se ha observado sinergismo entre *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* y *B. thuringiensis* subsp. *medellin*, pero no entre las toxinas de las cepas de *B. thuringiensis* activas contra lepidópteros o coleópteros.

**Mosaicos.** Esta estrategia consiste en fumigar con diferentes toxinas, campos de cultivo que se encuentren adyacentes; sin embargo, si las toxinas producen resistencia cruzada, esta estrategia no tendría mayor valor, y tal vez por ello no ha recibido mucha atención por parte de los investigadores.

**Rotaciones.** El uso de rotaciones de toxinas o insecticidas se basa en la hipótesis de que la frecuencia

de individuos resistentes disminuiría si se aplica una toxina diferente (Tabashnik, 1989); como en el caso anterior, la utilización de toxinas contra las cuales las plagas generan resistencia cruzada, disminuye el valor de esta estrategia. Este tipo de alternativas es muy útil en el caso en que la resistencia genere un alto costo de adaptación, o cuando no exista posibilidad de que las plagas generen resistencia cruzada a las toxinas.

**Dosis ultra altas.** Bajo condiciones experimentales, si se aplica una dosis muy alta de toxina de *B. thuringiensis*, se espera que ningún individuo sobreviva. Sin embargo, la aplicación de este tipo de dosis puede ser muy costosa si se tiene en cuenta que las líneas resistentes son 1000 veces menos sensibles; por lo tanto, es poco probable que esta estrategia pueda ser parte del manejo de la resistencia, más aún, cuando se sabe que en algunas especies de insectos, las líneas resistentes tienen una muy baja afinidad del receptor por la toxina, y que esta puede llegar a ser casi nula (Bravo et al., 1992a, Ferré et al., 1991).

**Refugios.** Posiblemente la manera más segura de manejar la resistencia de los insectos es el establecimiento de refugios espacio-temporales. Ya se ha visto anteriormente cómo la resistencia en algunas especies de insectos es inestable; por lo tanto, la idea de crear refugios donde no se aplique *B. thuringiensis* puede ayudar a mantener un conjunto de individuos genéticamente sensibles, que luego se cruzarían con los individuos resistentes de tal manera que la dispersión del alelo resistente en la nueva generación de insectos resultaría menos favorecida, asumiendo que la resistencia es generada por un gen recesivo (McGaughey, 1985, McGaughey y Beeman, 1988). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha determinado que en algodón transgénico, se deben establecer estrategias de manejo de la resistencia, y por lo tanto, los cultivadores de algodón tienen dos opciones que están basadas en el concepto de refugios. En la primera, por cada 100 hectáreas de cultivo, se deben plantar al menos 4 con algodón no transgénico. Este 4% de refugio no puede ser tratado con insecticidas que matan la mayoría de las plagas en algodón. La segunda indica que por cada 100 hectáreas de algodón, se deben plantar 25 de algodón no transgénico, pero estas pueden ser tratadas con insecticidas diferentes a *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Tabashnik, 1997).

**Ingeniería de proteínas.** Algunas de las toxinas Cry1 pueden ser consideradas como mutantes naturales del holotipo, ya que solamente difieren de este en unos pocos aminoácidos. Con el ánimo de conocer los dominios funcionales de las proteínas, se han modificado algunas de ellas mediante mutagénesis específica de sitio; ello ha permitido conocer las regiones mínimas involucradas en la toxicidad

(Schnepf y Whiteley, 1985), identificar los diferentes dominios estructurales y funcionales (Haider y Ellar, 1989), estudiar las regiones involucradas en unión al receptor (Rajamohan et al., 1996), y crear híbridos para identificar regiones determinantes en la especificidad (Ge et al., 1989, 1991, Schnepf et al., 1990, Honée et al., 1991).

Se han empleados diversos métodos para identificar los aminoácidos esenciales en el reconocimiento del receptor por parte de las toxinas de *B. thuringiensis*; todos ellos implican sustituciones o deleciones en los aminoácidos que conforman el dominio II entre las hojas 6, 7, y 8 (Figura 5). Como ejemplo del conocimiento que se ha reunido sobre la relación entre la estructura y la función de las proteínas Cry, se ha logrado manipular sus secuencias para construir mutantes como el denominado DF-1, producida por sustitución aminoacídica sobre la secuencia de la toxina Cry1Ab1; esta proteína, muestra una potencia 36 veces superior a la que presenta la toxina nativa y exhibe una afinidad de unión por su receptor 18.6 veces mayor (Rajamohan et al., 1996).

Finalmente hay que considerar la estabilidad o inestabilidad de la resistencia. La inestabilidad de la resistencia de algunas especies de insectos a las toxinas de *B. thuringiensis*, ha sido reportada por Tabashnik et al., (1994). Se define como la tendencia a la disminución de la frecuencia de los genotipos resistentes en una población, en ausencia de eventos migratorios. Esta inestabilidad es medida como el cambio en el logaritmo de la concentración letal media por generación. Se ha demostrado que en siete poblaciones de *P. xylostella*, la resistencia disminuye rápidamente cuando se mantienen poblaciones resistentes en ambientes donde no existía la presión de selección por las toxinas, mientras que en otras especies de insectos (*H. virescens*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Musca domestica* y *P. interpunctella*), bajo las mismas condiciones, la resistencia disminuye lentamente o no lo hace. Esta observación sugiere que la continuidad de la resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* no está necesariamente circunscrita al mantenimiento de la presión de selección; lo que dificulta la estimación de su ventaja adaptativa, en tanto no se precise el comportamiento evolutivo global del gen (ó genes) que la determinen.

### Conclusiones y Perspectivas.

La investigación sobre la bacteria entomopatógena *B. thuringiensis*, parece haber seguido una patrón de crecimiento exponencial durante este siglo, con obvios períodos de receso durante las guerras mundiales y un período de 30 años en el que se desarrollaron y usaron ampliamente los insecticidas

químicos. Lo anterior llevaría a pensar que el próximo siglo, constituirá un reto para la biotecnología basada en esta bacteria. Hasta hoy, las colecciones que de ella se han realizado satisfacen parcialmente las expectativas de los gremios a nivel mundial, lo que se refleja en el creciente número de compañías dedicadas a investigar sobre este organismo en particular y en los logros obtenidos por la comunidad científica en general; sin embargo, es menester llamar la atención sobre la importancia de aumentar estas colecciones y lo que es más fundamental, caracterizar los aislamientos allí incluidos de acuerdo a su eventual toxicidad hacia nuevos organismos, además de la detección de cepas con niveles de toxicidad superior a las ya conocidas que tengan potencial para un desarrollo biotecnológico.

El uso de las metodologías más recientes en ingeniería de proteínas, como es el análisis combinatorio de sus regiones, ha permitido conocer con mayor resolución las relaciones estructura-función de estas toxinas y usar este conocimiento para mejorar la actividad de las proteínas existentes; así como, conocer el mecanismo de acción sobre los organismos susceptibles, para lo cual se ha postulado el modelo de paraguas. De otro lado, la caracterización de fenómenos de transposición de segmentos de DNA regulados por secuencias específicas, fruto del conocimiento que se ha recopilado sobre la genética molecular de esta bacteria, ha permitido aplicar las más novedosas técnicas de ingeniería genética para desarrollar cepas mejoradas y/o transferir los genes involucrados en la toxicidad hacia huéspedes alternativos, los cuales se suman al amplio grupo de organismos modificados con genes *cry* por otras metodologías. La gran mayoría de estos enfoques han sido suscitados por el hallazgo de los fenómenos de resistencia genética más complejos conocidos hasta hoy, la resistencia a *B. thuringiensis*.

La descripción de nuevos tipos de proteínas Cry, así como otros tipos de toxinas que amplíen el espectro de acción de las cepas de *B. thuringiensis*, promete ser una fuente continua de factores importantes para el control biológico de plagas y vectores de enfermedades. Las eventuales nuevas toxinas precisan un estudio meticuloso y suficientemente exhaustivo para disminuir la probabilidad del desarrollo de organismos resistentes a nivel de campo, tarea que este siglo de investigación deja como legado a futuras generaciones de científicos comprometidos con el desarrollo de alternativas ecológicamente amables con nuestro ya deteriorado planeta.



## BIBLIOGRAFIA

- Agaisse, H. and D. Lereclus.** 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *J. Bacteriol.* 177:6027-6032.
- Agaisse, H. and D. Lereclus.** 1996. Génétique moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. *Annales de L'Institut Pasteur (Actualités)* 7:261-269.
- Agaisse, H.; S. Salamitou; A. Bravo; and D. Lereclus.** 1996. Genetic determinants involved in *Bacillus thuringiensis* cry gene expression. Abstracts of the 29<sup>th</sup> Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *Bacillus thuringiensis*). Córdoba, España, Septiembre 01-06.
- Angsuthanasombat, C.; N. Crickmore; and D.J. Ellar.** 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *FEMS Microbiol. Let.* 94:63-68.
- Aronson, A., Han, E.S., McGaughey, W., and D. Johnson.** 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:981-986.
- Aronson, A.I.** 1993. Insecticidal Toxins. In: Sonenshein, A.L.; J.A. Hoch; and R. Losick (Eds.). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. ASM Press, pp. 625-644.
- Aronson A.** 1995. The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4057-4060.
- Baldwin, B.** 1987. Commercialization of microbially produced pesticides. *Intern. Industr. Biotechn.* 7:290-293.
- Baum, J.A. and T. Malvar.** 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 18:1-12.
- Baum, J.A.; M. Kakefuda; and C. Gawron-Burke.** 1996. Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4367-4373.
- Becker, N., and J. Margalit.** 1993. Use of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice (Eds. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs). pp 147-170. John Wiley and Sons, Chichester.
- Bone LW,** 1989. Activity of commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrongylus colubriformis* and *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 53:276-277.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S., and M. Peferoen.** 1992a. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60:247-253.
- Bravo, A., Jansens, S., and M. Peferoen.** 1992b. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* 60:237-246.
- Bron, Sierd.** 1990. Plasmids. In: Harwood, C.R. and S.M. Cutting (Eds.). *Molecular biological methods for Bacillus*. Modern Microbiological Methods, John Wiley and Sons, pp. 75-174.
- Burgues, H.D. and J. Hurst.** 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *J. Invertebr. Pathol.* 30:131-139.
- Carlberg, G.; L. Tikkanen; and A. Abdel-Hameed.** 1995. Safety testing of *Bacillus thuringiensis* preparations, including thuringiensin, using the *Salmonella* assay. *J. Invertebr. Pathol.* 66:68-71.
- Chilcott, C.N. and P.J. Wigley.** 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* 61:244-247.
- Choma, C.T., Surewicz, W.K., and H. Kaplan.** 1991. The toxic moiety of the *Bacillus thuringiensis* protoxin undergoes a conformational change upon activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:933-938.
- Cooper, N.; M.S. Reynoso; L.Tanabe-Nolley; S. Kalman; and T. Yamamoto.** 1996. Expression of a crystal protein gene integrated into a sporulation gene on the *Bacillus thuringiensis* chromosome. Abstracts of the 29th Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *Bacillus thuringiensis*). Córdoba, España, Septiembre 01-06.
- Crickmore, N., C. Nicholls, D.J. Earp, T.C. Hodgman, and D.J. Ellar.** 1990. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal delta-endotoxin combinations. *Biochem. J.* 270:133-136.
- Crickmore, N.** 1995. Revision of the *Bacillus thuringiensis* Cry gene nomenclature. *SIP-Newslett.* 27:21.
- Damgaard, H.** 1996. Environmental Aspects of the Bacterial Insect Pathogen *Bacillus thuringiensis*. Ph.D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Delécluse, A.; C. Bourguin; A. Klier; and G. Rapoport.** 1989. Nucleotide sequence and characterization of a new Insertion element, IS240, from *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Plasmid* 21:71-78.
- Delécluse, A., Barloy, F., and M.L. Rosso.** 1996. Les bactéries pathogènes des larves de diptères: structure et spécificité des toxines. *Ann. Institut Pasteur/ Actualités* 7:217-231.
- Donovan, W.P.; C. Dankocsik; and M.P. Gilbert.** 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 170:4732-4738.
- Du, C., Martin, P.A.W., and K. W. Nickerson.** 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environm. Microbiol.* 60:3847-3853.
- Dulmage, H.T.** 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertebr. Pathol.* 15:232-239.
- Ellar, D.J.** 1996. Molecular genetics of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein toxins and their receptors. Abstracts of the 29th Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *Bacillus thuringiensis*). Córdoba, España, Septiembre 01-06.
- Estruch, J.J.; G.W. Warren; M.A. Mullins; G.J. Nye; J.A. Craig; and M.G. Koziel.** 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5389-5394.
- Federici, B.A. and F.J. Johnson.** 1996. The spore complex of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* potentiates the toxicity of CytA to mosquito larvae. Abstracts of the 29th Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *Bacillus thuringiensis*). Córdoba, España, Septiembre 01-06.
- Feitelson, J.S., Payne, J., and L. Kim.** 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technology* 10:271-276.
- Ferré, J. Real., M.D., Van Rie, J., Jansens, S. and M. Peferoen.** 1991. Resistance to *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5119-5123.
- Ge, A.Z., Shivarona, N.I., and D.H. Dean.** 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain in a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4037-4041.
- Ge, A.Z.; R.M. Pfister; and D.H. Dean.** 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene* 93:49-54.
- Ge, A.Z., Rivers, D., Milne, R., and D.H. Dean.** 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958.
- Gelernter, W. and G.E. Schwab.** 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae, and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice (Eds. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs). pp. 89-104. John Wiley and Sons, Chichester.
- Georghiou, G.P. and M. Wirth.** 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Env. Microbiol.* 63:1095-1101.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., and P.V. Pietrantonio.** 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Gill, S.** 1995. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90:69-74.
- Gill, S.S.; and P.V. Pietrantonio.** 1995. Mechanism of action of insecticidal *Bacillus thuringiensis* endotoxins. En: COLCIENCIAS, CIB, IBUN, CORPOICA, VECOL, y el Instituto de Inmunología-Hospital San Juan de Dios. *Memorias del I curso-taller internacional: aislamiento, caracterización y producción de Bacillus thuringiensis para el control de plagas.* Agosto 22-Septiembre 01, 1995, Santafé de Bogotá, Colombia.
- Goldberg, L., and J. Margalit.** 1978. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosq. News*, 37:355-358.

- González, J.M. (Jr.); H.T. Dulmage; and B.C. Carlton.** 1981. Correlation between specific plasmids and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 5:351-365.
- Gould, F.** 1988a. Genetic engineering, integrated pest management and the evolution of pests. Trends Ecol. Evol. 3:515-518.
- Gould, F.** 1988b. Evolutionary biology and genetically engineered crops. Bioscience 38:26-33.
- Gould, F., Anderson, A., Landis, D., and H. van Mallaert.** 1991. Feeding behavior and growth of *Heliothis virescens* larvae on diets containing *Bacillus thuringiensis* formulations or endotoxins. Entomol. Exper. Appl. 58:199-210.
- Gould, F., Martinez-Ramirez, A., Aderson, A., Ferré, J., Silva, F.J., and W.J. Moar.** 1992. Broad spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7986-7988.
- Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D.G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R., and M. Laster.** 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3515-3523.
- Haider, M.Z. and D.J. Ellar.** 1989. Functional mapping of an entomocidal  $\delta$ -endotoxin. Single amino acid changes produced by site directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. J. Mol. Biol. 208:183-194.
- Heckel, D.G.** 1994. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects. Biocontrol Sci. Technol. 4:405-417.
- Heckel, D.G., Gahan, L.C., Gould, F., and A. Anderson.** 1997. Identification of a linkage group with a major effect on resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 90:75-86.
- Höfte, H. and H.R. Whiteley.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- Honée, G., Convents, D., Van Rie, J., Jansens, S. Peferoen, M., and B. Visser.** 1991. The C-terminal domain of the toxic fragment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding. Mol. Microbiol. 5:2799-2806.
- Institut Pasteur, Unite des Bacteries Entomopathogenes, International Entomopathogenic Bacillus Centre.** 1996. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (Classified by H serotypes).
- Janniére, L.; A. Gruss; and S.D. Ehrlich.** 1993. Plasmids. In: Sonenshein, A.L.; J.A. Hoch; and R. Losick (Eds.). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. ASM Press, pp. 625-644.
- Johnson, M.W., and F.Gould.** 1992. Interaction of genetically engineered host-plant resistance and natural enemies of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in tobacco. Environm. Entomol. 21:586-597.
- Knight, P.J.K., Crickmore, N., and D.J. Ellar.** 1994. The receptor of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. Microbiol. 11:429-436.
- Knowles, B.H., and D.J. Ellar.** 1987. Colloid osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. Biochem. Biophys. Acta. 924:509-518.
- Lecadet, M.M.; J. Chaufaux; J. Ribier; and D. Lereclus.** 1992. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. Appl. Environm. Microbiol. 58:840-849.
- Lereclus, D., Ribier, J., Klier, A., Menou, G., and M.M. Lecadet.** 1984. A transposon like structure related to the  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. EMBO J. 3:2561-2567.
- Lereclus, D.** 1988. Génétique et biologie moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. Bull. Institute Pasteur 86:337-371.
- Lereclus, D.; O. Arantès; J. Chaufaux; and M.M. Lecadet.** 1989. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Letters 60:211-218.
- Lereclus, D.; H. Agaisse; M. Gominet; and J. Chaufaux.** 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* *spo0A* mutant. Biotechnol. 13:67-71.
- Lereclus, D.** 1996. Views on the ecology and the virulence of *Bacillus thuringiensis*. Abstracts of the 29th Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *Bacillus thuringiensis*). Córdoba, España, Septiembre 1-6.
- Levot, G.W.** 1995. Resistance and the control of sheep ectoparasites. Intl. J. Parastol. 25:1355-1362.
- Li, J., Carrol J, Ellar D.** 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 resolution. Nature 353:815-821.
- MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Jokerst, R.S., and R.L. Fuchs.** 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8930-8933.
- Martin, P.A.W., and R.S. Travers.** 1989. Worldwide distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environm. Microbiol. 55:2437-2442.
- McGaughey, W.H.** 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 229:193-195.
- McGaughey, W.H. and D.E. Johnson.** 1987. Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) resistance to different strains and mixtures of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 80:1122-1126.
- McGaughey, W.H. and R.W. Beeman.** 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of the indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) J. Econ. Entomol. 81:28-33.
- Meadows, M.P.; D.J. Ellis; J. Butt; and H.D. Burges.** 1992. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. Appl. Environm. Microbiol. 58:1344-1350.
- Menn, J.J.** 1996. Biopesticides: Has the time come?. J. Environ. Sci. Health. B31:383-389.
- Narva, K.E., Schwab, G.E., Galasan, T. and J.M. Payne.** 1991. United States Patent Number 5236843.
- Ohba, M., Tantichodok, A. and K. Aizawa.** 1981. Production of heat-stable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. J. Invertebr. Pahol. 38:26-32.
- Orduz, S., Rojas, W., Correa, M.M., Montoya, A.E., and H. de Barjac.** 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 59:99-103.
- Orduz, S.; N. Restrepo; M.M. Patiño; and W. Rojas.** 1995. Transfer of toxin genes to alternate bacterial hosts for mosquito control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90:97-107.
- Orduz, S.; T. Diaz; N. Restrepo; M.M. Patiño; and M.C. Tamayo.** 1996. Biochemical, immunological and toxicological characterization of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91:231-237.
- Orduz, S.** 1997. Biochemical and Molecular Characterisation of the Mosquito Active Bacterium *Bacillus thuringiensis* subespecie *medellin*. Tesis (Ph.D.), Corporación Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia, Medellín. 134 pp.
- Payne, J.M., Kennedy, M.K., Randall, J.B., and D.O. Brower.** 1991a. United States Patent Number 0480762.
- Payne, J.M., Uyeda, K.A., Stalder, C.J., and T.E. Michaels.** 1991b. United States Patent Number 4609550.
- Poncet, S.; C. Bernard; J.Cayley; A. Klier; and G. Rapoport.** 1996. Construction of new strains of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and *B. sphaericus* with improved entomocidal properties using *in vivo* recombination. Abstracts of the 29th Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *Bacillus thuringiensis*). Córdoba, España, Septiembre 1-6.
- Porter, A.G.; E.W. Davidson; and J.W. Liu.** 1993. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. Microbiol. Rev. 57:838-861.
- Porter, A.G.** 1996. Mosquitocidal toxins, genes and bacteria: the hit squad. Parasitol. Today 12:175-179.
- Purcell, M. And D.J. Ellar.** 1996. An investigation into the composition and mosquitocidal activity of the *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* parasporal crystal. Abstracts of the 29th Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *Bacillus thuringiensis*). Córdoba, España, Septiembre 1-6.
- Rafta, K.F.** 1989. Genetic engineering of trees to enhance resistance to insects. Bioscience 39:524-534.
- Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J.A. Curtiss, A., and D. H. Dean.** 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: Mutations at domain II of CylAb enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14338-14343.
- Rao, D.R., Mani, T.R., Rajendran, R., Joseph, A.S., Gajanana, A., and R. Reuben.** 1995. Development of high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. J. Amer. Mosq. Control Assoc. 11:1-5.

- Realpe, M.A.** 1997. Desarrollo de cepas de *Bacillus thuringiensis* recombinantes por introducción del gen que codifica la principal - endotoxina mosquitocida de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. Tesis de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín. 45 pp.
- Regis, L., Silva-Filha, M.H.N.L., de Oliveria, C.M.F., Rios, E.M., da Silva, S.B., and A. Furtado.** 1995. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of Filariasis in Recife. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90:115-120.
- Restrepo, N.; D. Gutierrez; M.M. Patiño; I. Thiéry; A. Delécluse; and S. Orduz.** 1997. Cloning, Expression and Toxicity of a Mosquitocidal Toxin Gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92:257-262.
- Salama, H.S. and N.O. Morris.** 1993. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice (Eds. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs). pp237-253. John Wiley and Sons, Chichester.
- Salamitou, S.; H. Agaisse; M. Gominet; A. Lövgren; and D. Lereclus.** 1996. Regulation of *Bacillus thuringiensis* genes involved in virulence. Abstracts of the 29th Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *Bacillus thuringiensis*). Córdoba, España, Septiembre 1-6.
- Sanchis, V., Lereclus, D., Menou, G., Chaufaux, J., and M. Lecadet.** 1988. Multiplicity of d-endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. Mol. Microbiol. 2:393-404.
- Sanchis, V; Chaufaux J. and D. Lereclus.** 1996. Amélioration biotechnologique de *Bacillus thuringiensis*: les enjeux et les risques. Annales de L'Institut Pasteur (Actualités) 7:271-284.
- Schnepf, H.E.** 1995. *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. Curr. Opin. Biotechnol. 6:305-312.
- Schnepf, H.E., and H.R. Whiteley.** 1985. Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. J. Biol. Chem. 260:6273-6280.
- Schnepf, H.E., Tomczak, K., Ortega, J.P., and H.R. Whiteley.** 1990. Specificity determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 265:20923-20930.
- Sherratt, D.** 1989. Tn3 and related transposable elements: site-specific recombination and transposition. In Mobile DNA (Eds. D.E. Berg, and M.M. Howe) pp. 163-184. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Shimizu, M.; S. Ijima; and T. Kobayashi.** 1992. Production of insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* by cultivation of recombinant *Escherichia coli*. J. Ferment. Bioeng. 74:163-168.
- Sims, S.R., and T.B. Stone.** 1991. Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. J. Invertebr. Pathol. 57:206-210.
- Smith, R.A., and G.A. Couche.** 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Appl. Environm. Microbiol. 57:311-315.
- Tabashnik, B.E.** 1986. Evolution of pesticide resistance in predator-prey systems. Bull. Entomol. Soc. Am. 32:156-161.
- Tabashnik, B.E.** 1989. Managing resistance with multiple insecticide tactics: theory, evidence and recommendations. J. Econ. Entomol. 82:1263-1269.
- Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N.L., and M.W. Johnson.,** 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 86:635-644.
- Tabashnik, B.E.** 1992. Resistance risk assessment: Realized heredability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae), and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 83:1671-1676.
- Tabashnik, B.E.** 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 39:47-79.
- Tabashnik, B.E.; N. Finson; F.R. Groeters; W.J. Moar; M.W. Johnson; K. Luo; and M.J. Adang.** 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4120-4124.
- Tabashnik, B.E.** 1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3488-3490.
- Thiery, I.; A. Delécluse; M.C. Tamayo; and S. Orduz.** 1997. Identification of a gene for CytA-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and their expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. Appl. Environm. Microbiol. 63:468-473.
- Thompson, M.A.; H.E. Ernest; and J.S. Feitelson.** 1995. Structure, function and engineering of *Bacillus thuringiensis* toxins. In Genetic Engineering, Vol.17, pp. 99-117. Plenum Press.
- Van Frankenhuyzen, K.** 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice (Eds. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs). pp 1-36. John Wiley and Sons, Chichester.
- Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson D.E., Barnett, B.D., and H. Van Mellaert.** 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 247:72-74.
- Whiteley, H.R. and H.E. Schnepf.** 1986. The Molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. 40:549-576.
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H., and R. Sato.** 1997. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. Eur. J. Biochem. 246:652-657.