



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IMPORTANCIA DE Bacillus thuringiensis EN  
LA PRODUCCION DE BIOINSECTICIDA**

**TRABAJO ESCRITO  
VIA EDUCACION CONTINUA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A:  
CONCEPCION MANZANO GAYOSSO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**1994**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

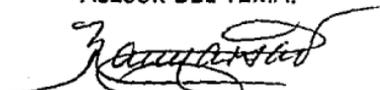
## JURADO

Presidente	Prof: ELDA PENICHE QUINTANA
Vocal	Prof: MARIA DEL CARMEN CORTES DECUIR
Secretario	Prof: RAUL GARZA VELASCO
1er. Suplente	Prof: ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ
2do. Suplente	Prof: MAITE ASTIGARRAGA ZAVALA

Sitio donde se desarrolló el tema;

El tema se desarrolló en la Biblioteca de la Facultad de Química y la Biblioteca Central de la UNAM.

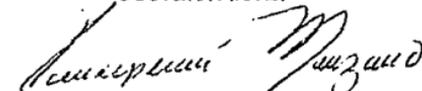
ASESOR DEL TEMA:

  
Q.F.B. RAUL GARZA VELASCO.



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

SUSTENTANTE:

  
CONCEPCION MANZANO GAYOSSO.

A mi esposo Fernando, con admiración y agradecimiento por sus consejos y el gran apoyo que siempre me ha brindado. Gracias por creer en mí; te quiero.

A mis hijos, por su paciencia y la motivación que representaron en la culminación de esta meta. Gracias; los Adoro.

A mi hermana Patricia, con cariño y admiración su valiosa ayuda constituyó uno de mis principales estímulos. Gracias.

## INDICE

INTRODUCCION .....	1
OBJETIVOS .....	3
I. GENERALIDADES	
I. Antecedentes históricos .....	4
II. Características microbiológicas .....	5
III. Insectos plaga susceptibles a <i>B.thuringiensis</i> .....	8
II. TOXINAS PRODUCIDAS POR <i>B. thuringiensis</i> .....	11
Producción de $\delta$ -endotoxina .....	12
Mecanismo de acción de la $\delta$ -endotoxina .....	15
Desarrollo de resistencia hacia la $\delta$ -endotoxina .....	19
Estructura del gen Cry .....	27
Organismos transformados con genes de $\delta$ -endotoxina ....	30
Plantas transgénicas .....	31
Bacterias transgénicas receptoras de genes de $\delta$ - endotoxina .....	34
CONCLUSIONES .....	36
BIBLIOGRAFIA .....	37

## INTRODUCCION

En general, los agentes biológicos empleados para establecer el control biológico de las plagas corresponden a microorganismos que se encuentran distribuidos en la naturaleza, e incluyen virus y bacterias.

Desde el punto de vista comercial, el bioinsecticida más importante es el género bacteriano *Bacillus*, del cual solamente se han estudiado cuatro especies: *Bacillus thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. leucomorbus* y *B. sphaericus*; no obstante, entre ellas, *B. thuringiensis* es la más utilizada industrialmente, ya que las demás involucran problemas técnicos para reproducirse a gran escala.

*B. thuringiensis* es una bacteria Gram positiva del suelo que produce inclusiones proteicas cristalinas durante su proceso de esporulación; dichas proteínas se denominan  $\delta$ -endotoxinas, y poseen una alta actividad biocida contra larvas de diferentes insectos. A la fecha se han identificado una gran cantidad de cepas de *B. thuringiensis*, con diferentes rangos de acción insecticida, en contra de dípteros, coleópteros, y lepidópteros.

Recientemente, la clonación de los genes  $\delta$ -endotoxina ha permitido el planteamiento de nuevas estrategias para proteger a los cultivos del daño causado por insectos.

El presente trabajo intenta resumir los principales aspectos asociados a *B. thuringiensis* y a su aplicación como bioinsecticida.

**OBJETIVOS**

- Describir las características de *B. thuringiensis*, involucradas en el empleo de este microorganismo como bioinsecticida.
- Enumerar los insectos susceptibles a la acción de la  $\delta$ -toxina de *B. thuringiensis*.
- Mencionar las expectativas estratégicas para elevar el poder insecticida relacionado con *B. thuringiensis*.

## I. GENERALIDADES

### i. Antecedentes históricos

En 1901-1902, el japonés Ishiwata aisló a una bacteria relacionada con un padecimiento del gusano de seda *Bombix mori*, a la cual denominó *Bacillus* de la enfermedad de Sotto. Posteriormente, en 1911, Berlins detectó a la especie *B. thuringiensis* en la larva de la palomilla de harina y Hannay observó cristales con forma de diamante en preparaciones de cultivos esporulados del mismo microorganismo, sugiriendo que dichos cristales podrían representar una sustancia tóxica que indujera trastornos sanguíneos en las larvas de los insectos (2, 9).

Más tarde, Angus encontró que el mesenterón del gusano de seda eliminaba una sustancia tóxica, producto de la esporulación de *B. thuringiensis*; en concreto, observó la inclusión cristalina en las células del hospedero, mediante microscopio de contraste de fases y, además, comprobó la toxicidad de esa particular estructura (1, 6).

En 1951 y 1954 -respectivamente-, Stein Hans y Hall aislaron a *B. thuringiensis* en agar nutritivo, obteniendo material esporulado seco,

con el cual provocaron un 96.8 % de mortalidad a diversas plagas conformadas por lepidópteros (6).

En 1959, Mc Connel y Richards descubrieron una sustancia tóxica contenida en el líquido de los medios en que se cultivaba a *B. thuringiensis* y, secuencialmente, demostraron su toxicidad, inyectándola en el homocelo del gusano de seda (2).

En la actualidad, el nombre comercial de esa sustancia es Sporeline; aunque éste fue producido por primera vez en Francia -durante los años 30-, lo cierto es que se registró hasta 1958 en los Estados Unidos (11).

## **ii. Características microbiológicas de *B. thuringiensis***

Esta bacteria es uno de los miembros del grupo I dentro del género *Bacillus*, mismo que además incluye a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* y *B. anthracis*. Está muy relacionada con *B. cereus* y sólo se diferencia de ésta por la presencia de un cuerpo paraesporal y por sus antígenos flagelares (3, 6, 7).

Las células vegetativas de esta especie son Gram positivas, en forma de

bastón, esporógenas y entomopatógenas facultativas; su tamaño promedio es de 2 a 5  $\mu$  por 1  $\mu$ , poseen flagelos peritricos y se dividen por fisión binaria, manifestándose frecuentemente en cadena; además, durante su proceso de esporulación, numerosas variedades forman un cristal proteínico bipyramidal que se localiza fuera de la membrana parabasal y lo liberan al término de la esporogénesis, previa ruptura de la membrana plasmática. Dicho cristal parasporal, por cierto, es el que resulta tóxico para las larvas de diversos insectos.

La actual clasificación taxonómica de *B. thuringiensis* se resume a continuación (8):

Orden: ..... *Eubacteriales*

Suborden: ..... *Eubacterineae*

Familia: ..... *Bacillaceae*

Género: ..... *Bacillus*

Especie: ..... *thuringiensis*

En 1962, H. de Barjac y A. Bonnefoi llevaron a cabo estudios bioquímicos y serológicos de las cepas de bacterias cristalógenas, proponiendo por primera vez una clasificación basada en los antígenos flagelares (antígeno H) de las formas vegetativas, si bien ésta debía complementarse principalmente con pruebas bioquímicas; de esta manera, hasta 1987 se habían descrito un total de 33 variedades. No obstante, en 1988 se diseñó otra clasificación más útil y aplicativa, la cual se basa en el tipo de hospedador al que infectan las distintas cepas de *B. thuringiensis*; las variedades reconocidas actualmente son (8):

- a) La díptero-específica
- b) La lepidóptero-específica
- c) La coleóptero-específica
- d) La lepidóptero y díptero-específica
- e) La de actividad insecticida desconocida

### III. Insectos plaga susceptibles a *B. thuringiensis* (10).

1. Orden *Coleóptera*. Es el que menos daños agrícolas produce, si bien destacan las siguientes especies

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Planta a la que infecta</b>
<i>Calaspidema atrum</i>	cuca	alfalfa
<i>Phytonomus variabilis</i>	gusano verde	alfalfa
<i>Scolytidae</i> sp	barrenillos	olivo y frutales
<i>Melolontha</i>	gusano blanco	roble
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	escarabajo colorado	papa
	de la papa	
<i>Haltica ampelophaga</i>	pulgón de la vid	vid

2. Orden *Díptera*. Incluye unas 75,000 especies, algunas de las cuales resultan muy nocivas, no sólo para las plantas, sino también para el humano y los animales, puesto que transmite padecimientos muy graves tales como paludismo, fiebres tíficas, enfermedad del sueño, etc. Entre las especies de mayor importancia agrícola figuran las siguientes:

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Planta a la que Infecta</b>
<i>Tipula oleracea y paludosa</i>	mosquito	daños en raíces
<i>Cecidomyidae</i>	mosquito	trigo
<i>Mayetiola destructor</i>	mosquito	flores y frutos de perales
<i>Contarinia pyrivora</i>	mosquito	flores y frutos de perales
<i>Perrisia affinis</i>	mosquito	violeta
<i>Dacus oleae</i>	mosca	aceltuna
<i>Ceratitis capitata</i>	mosca	frutas
<i>Rhagoletis cerasi</i>	mosca	cerezas
<i>Lonchaea aristella</i>	mosca	higo
<i>Liriomyza cicerina</i>	mosca	garbanzo
<i>Pegomya betae</i>	mosca	remolacha
<i>Chortophila brassicae</i>	mosca	col
<i>Chortophila antiqua</i>	mosca	cebolla

3. Orden *Lepidóptera*. Constituye una de las órdenes más numerosas que ocasionan daños agrícolas, destacando las siguientes especies:

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Planta a la que infecta</b>
<i>Cossus</i>	gusano taladro	árboles frutales
<i>Agrotis segetis</i>	gusano gris	almendro
<i>Phthorimaea operculella</i>	polilla de la papa	papa
<i>Platyedra gossypiella</i>	gusano rosado	algodón
<i>Hyponomeuta malinellus</i>	arañuelo	manzano
<i>Sparganothis pilleriana</i>	piral	la vid
<i>Chilo suppressalis</i>	gusano barrenador	arroz
<i>Pyrausta nubilalis</i>	gusano taladro	maíz
<i>Aglapoe Infausta</i>	gusano barrenador	almendro

## II. TOXINAS PRODUCIDAS POR *B. thuringiensis*

A la fecha se han descrito siete diferentes toxinas en las distintas cepas de *B. thuringiensis* (19):

- a) Fosfolipasa C-lectinasa ( $\alpha$ -exotoxina)
- b) Exotoxina termoestable ( $\beta$ -exotoxina)
- c) Enzima no identificada, que podría no ser tóxica ( $\gamma$ -endotoxina)
- d) Protoxina del cristal paraesporal ( $\delta$ -endotoxina)
- e) Toxina lábil
- f) Toxina soluble en agua
- g) Exotoxina "factor ratón"

Entre dichas toxinas, la  $\beta$ -exotoxina y la  $\delta$ -endotoxina son las más estudiadas, debido a sus propiedades antagónicas hacia diversas larvas de insectos.

$\beta$ -exotoxina, también conocida como "factor mosca", es termoestable y altamente tóxica para moscas y algunos otros insectos; de hecho, es un inhibidor potente de la RNA polimerasa de otras bacterias y de células animales, aunque también ocasiona mutaciones cromosomales a los

eritrocitos humanos (26).

Por su parte, la  $\delta$ -endotoxina se encuentra incluida en la proteína del cristal paraesporal, es soluble en soluciones alcalinas y se forma en las células vegetativas, al mismo tiempo que se produce la espora.

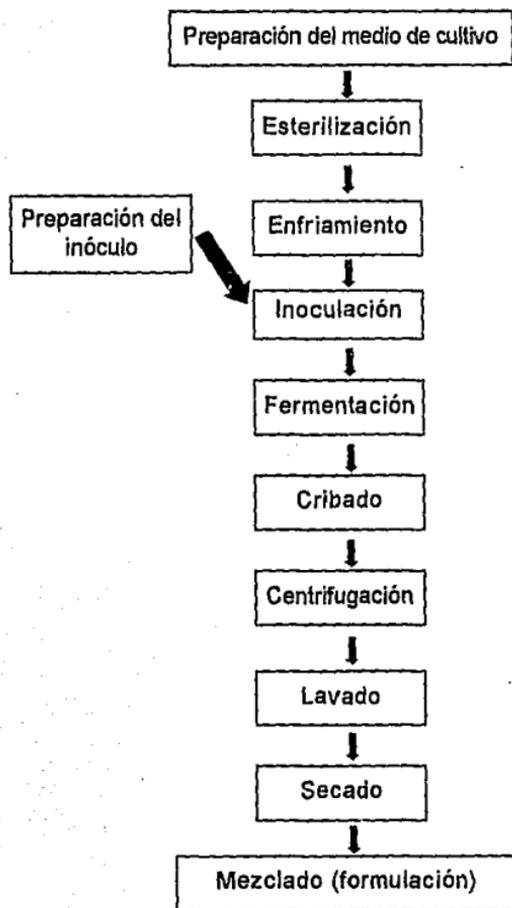
El cristal paraesporal se compone por subunidades glicoproteicas cuyo peso molecular es de 134,000 Da. Mientras la masa de una espora madura corresponde al 15 % de la célula vegetativa, el cristal alcanza un 12.5 a 17 % de la misma (6).

Por lo que respecta a la composición de aminoácidos de la parte proteica del cristal, destaca su elevado contenido en ácido glutámico y arginina.

### **Producción de $\delta$ -endotoxina**

El proceso de producción de  $\delta$ -endotoxina se basa en una "fermentación" batch, utilizándose un medio enriquecido y el inóculo de *B. thuringiensis*; al agotarse los nutrientes éste empieza a esporular y a formar los cristales de  $\delta$ -endotoxina (26).

Es muy importante subrayar que diversas cepas de *B. thuringiensis* producen distintas  $\delta$ -endotoxinas, con diferente especificidad y potencia; por ello, la selección de la cepa a utilizar constituye un punto crítico en la producción del bioinsecticida efectivo.



Esquema de la Producción del bioinsecticida de Bacillus thuringiensis (26).

Posteriormente, se separan las células, esporas y cristales, generalmente por centrifugación o extracción. La corriente que contiene al cristal se lava y se seca, y la formulación del producto final se concreta agregando un soporte y algunos otros aditivos, tales como leche en polvo, tensoactivos, tierra de diatomeas y talco mineral. La concentración final del bioinsecticida varía entre 3 y 10 % (p/p) y, aunque la mayoría de las presentaciones son en polvo, también existen algunas en solución (19, 26).

### **Mecanismo de acción de la $\delta$ -endotoxina**

Una vez que la larva ingiere la  $\delta$ -endotoxina, la protoxina es digerida en el intestino medio del insecto, vía las condiciones alcalinas y las proteasas presentes; de esta manera, se libera un péptido tóxico de menor tamaño, mismo que fluctúa entre los 60 a los 70 KDa (18, 26).

Estudios histopatológicos realizados con células del epitelio interno, demuestran degeneración de las microvellosidades apicales, hipertrofia de las células Goblet y columnares, vacuolización del citoplasma y lisis celular (19).

Una vez que la larva ha ingerido la protoxina, ésta es solubilizada en el ambiente alcalino del interior del intestino y es procesada a la forma tóxica, por acción de las proteasas. El siguiente paso consiste en la unión de la toxina al receptor presente en la membrana de las células susceptibles del insecto.

Experimentos realizados con diferentes toxinas y diversos insectos "blanco", han demostrado que existe una correlación estricta entre la unión de las toxinas al receptor del insecto blanco y la toxicidad de las primeras, ya que este evento es necesario para que ocurra la acción insecticida; no obstante, también se ha comprobado que, en algunos casos, ello no es suficiente para que muera el insecto, lo que sugiere que existen otros factores involucrados en el mecanismo de acción de la toxina de *B. thuringiensis* (17, 21, 34, 36).

Lógicamente, se ha encontrado que los receptores son diferentes en cada tipo de insecto, lo mismo que su abundancia y la eficiencia de la unión con la toxina. Hasta el momento se conoce muy poco acerca de la naturaleza bioquímica de los receptores y de su papel fisiológico dentro del intestino larvario. El modelo más aceptado plantea que, en la membrana de las células del hospedador, existen diferentes proteínas

que pueden funcionar como receptores de las toxinas de *B. thuringiensis*, y que diferentes insectos pueden tener varios receptores que son reconocidos por diferentes toxinas. De esta manera, se explica la razón del amplio rango de especificidad de las diferentes  $\delta$ -endotoxinas.

Estudios inmunocitoquímicos sobre la localización de la  $\delta$ -endotoxina dentro del intestino de larvas alimentadas con diferentes toxinas, han demostrado que la toxina se une eficazmente a la microvellosidad apical y nunca, durante todo el síndrome patológico, penetra al citoplasma celular o se disemina hacia otros órganos (5, 18).

En cuanto al efecto de la  $\delta$ -toxina sobre la membrana celular, existen varias teorías: experimentos realizados por Wolfersberger y cols, en los cuales se emplearon vesículas formadas por microvellosidades aisladas del epitelio intestinal de *Trichoplusia*, se observó que dicha toxina alteraba la permeabilidad del potasio. En este sentido, los autores proponen la existencia de una interacción entre esta última y el receptor, para alterar los canales mediante los cuales se desplazan los iones potasio. Por otro lado, estudios realizados con vesículas formadas por las microvellosidades del epitelio de *Manduca sexta*, demostraron

que la entrada de ciertos aminoácidos al intestino medio es dependiente de un gradiente de potasio, mismo que es inhibido por la  $\delta$ -endotoxina (15, 27).

De cualquier manera, ocurre un consenso acerca de que la  $\delta$ -endotoxina altera la permeabilidad de sodio y potasio en estas vesículas, aunque también se ha encontrado que toxinas casi idénticas solamente modifican la permeabilidad del potasio, puesto que los iones sodio requieren de poros más grandes.

De hecho, Wolfersberger sugiere que el tamaño de los poros inducidos por la  $\delta$ -endotoxina puede variar, generándose algunos poros más selectivos que otros (36).

Recientemente se ha establecido que el efecto de la toxina puede bloquearse si las membranas se tratan con el inhibidor de canales de sodio (tetrodoxina) y que, en contraste, aquél se potencia cuando se emplea un inhibidor de canales de potasio (4-aminopiridina).

Otro trabajo realizado con *Manduca sexta* ha mostrado que la  $\delta$ -endotoxina es capaz de inhibir el transporte activo de potasio en el

Intestino medio de las larvas, resumiéndose que su acción afecta la permeabilidad del epitelio. Por último, cabe mencionar que Slatin et al (1990) reportaron que dos diferentes  $\delta$ -endotoxinas Cry I (A) y Cry III (A), forman canales iónicos selectivos en bicapas lipídicas planas, los cuales resultan altamente específicos para cationes (29).

### **Desarrollo de resistencia hacia la $\delta$ -endotoxina**

El rango de acción de una  $\delta$ -endotoxina específica puede variar por influencia de diferentes factores; de hecho, se considera que la larva puede afectar la solubilización y/o el procesamiento proteolítico de la protoxina, para transformarse en toxina (17, 37).

Adicionalmente, la toxina de *B. thuringiensis* tiene un tiempo de permanencia muy corto en el medio ambiente.

Lo antes mencionado, aunado a que la  $\delta$ -endotoxina es altamente específica, ha permitido que se generen pocos insectos resistentes a su acción insecticida; sin embargo, el uso masivo y constante de este bioinsecticida podría originar el desarrollo de insectos resistentes. Por

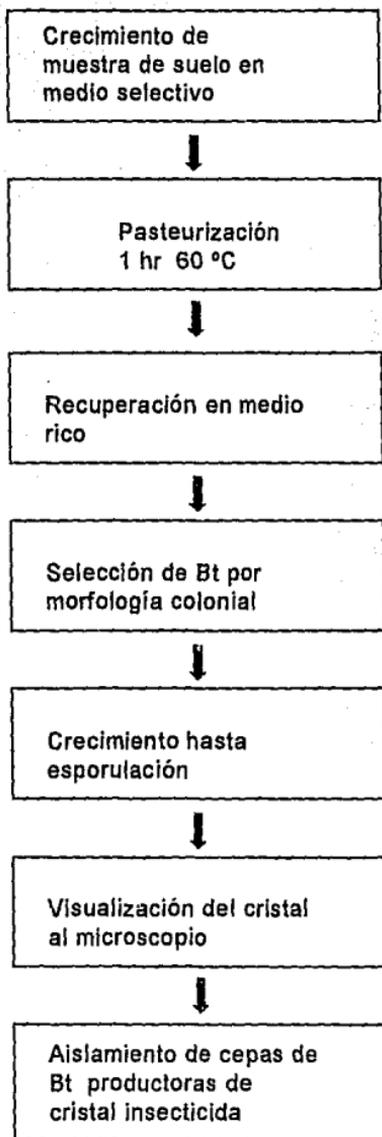
tal motivo, se deben diseñar estrategias que impidan o disminuyan esta posibilidad, cuya viabilidad se ha comprobado plenamente: en 1985, Mac Gaughey encontró que *Plodia interpunctella* desarrolló resistencia a productos endotóxicos en unas cuantas generaciones, concluyéndose que la resistencia se hereda en forma recesiva (20).

A nivel molecular, el mecanismo de resistencia aparenta deberse a alteraciones en el receptor de la toxina. No obstante, en un mismo insecto existen diferentes receptores y, por ende, puede aparecer resistencia contra una determinada variedad de toxina y que el insecto continúe siendo igualmente o más sensible a una segunda o tercera endotoxina (14, 33).

Como ya se ha señalado, los bioinsecticidas derivados de *B. thuringiensis* deben su efecto tóxico específico (para ciertos tipos de insectos) a la proteína del cristal denominada  $\delta$ -endotoxina, producida durante la fase de esporulación de la bacteria. A la fecha se han realizado intensas búsquedas de cepas de *B. thuringiensis*, con la finalidad de encontrar  $\delta$ -endotoxinas con un rango de acción diferente. El diagrama 2 muestra un esquema del procedimiento utilizado para aislar cepas de la especie mencionada a partir de muestras de suelo (5).

Mycogen, Ecogen, Plant Genetic Systems y el Departamento de Agricultura de EUA, figuran entre las organizaciones que cuentan con las colecciones más grandes de cepas de *B. thuringiensis* (alrededor de 40,000) y sus equipos de investigadores han observado que una gran cantidad de ellas manifiestan actividad biocida específica contra ciertos insectos clasificados como lepidópteros, coleópteros, dípteros o ácaros (13).

De hecho, muchos de los genes asociados a la producción de  $\delta$ -endotoxinas han sido clonados en otras bacterias y en plantas, con lo cual no sólo se han logrado verdaderos avances en cuanto a la producción de bioinsecticidas o en la defensa directa sino que, además, se han iniciado estudios más exitosos sobre su secuencia nucleotídica, mecanismos de regulación transcripcional y su relación estructural con otras proteínas.



Esquema del procedimiento utilizado para aislar cepas de Bacillus thuringiensis a partir de muestras de suelo (26).

El medio selectivo es un medio rico que provoca la germinación de diferentes esporas, pero que impide la germinación de las esporas de Bt, por ejemplo en presencia de acetato de sodio.

La pasteurización elimina todas las bacterias vegetativas así como los hongos

A la fecha los genes  $\delta$ -endotoxina que se han clonado, se denominan Cry y se clasifican en cinco grupos principales (Cry I, Cry II, Cry III, Cry IV, Cry V) y varias subclases. En total, se ha diseñado una familia con 26 genes diferentes que codifican para esta proteína, cada uno de los cuales resulta específico para un "blanco" determinado (16).

La tabla 1 muestra la familia de genes Cry clonados hasta la fecha, así como el porcentaje de homología que existe entre ellos, al compararse sus secuencias de aminoácidos.

Los genes Cry I son específicos contra insectos lepidópteros, son los más estudiados y se han clasificado en siete subgrupos, donde el subgrupo A -a su vez- tiene cuatro subdivisiones. Todos los genes Cry I codifican para una proteína de 130 a 140 KDa, que cristaliza formando cuerpos bipyramidales. Los cristales implicados son protoxinas que se solubilizan en el ambiente alcalino del intestino del insecto y la proteólisis correspondiente genera fragmentos tóxicos de 60 a 70 KDa. La parte o dominio tóxico de la protoxina está localizada en la mitad correspondiente a la región aminoterminal, que contiene a las regiones que confieren especificidad y toxicidad a la molécula. La otra mitad -carboxilo- resulta irrelevante para la actividad tóxica, aunque es muy

posible que se encuentre involucrada en la formación del cristal y, por ende, en su estabilidad, ya que contiene casi todos los residuos de cisteína, que generan los puentes disulfuro (16).

TABLA 1

CLASIFICACION DE LAS  $\delta$  - ENDOTOXINAS SEGUN SU ESPECIFICIDAD Y  
 PORCENTAJE DE HOMOLOGIA EN LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS  
 ENTRE ELLAS

Insecto susceptible	ICP	Porcentaje de homología entre toxinas																				
		IAa (a, b, c, d)	IB	IC	ID	IEa (a, b)	IF	IG	IIA	IIb	IIIA	IIb	IIc	IIId	IIe	IVA	IVb	IVc	IVd	VA (a, b)	VB	VC
Lepidóptero	Cry IA (a, b, c, d)	>85	45	60	65	67	64	42	25	25												
	CryIB	100	45	45	45	45	42	25	25	52	50	55	52	62	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryIC			100	61	61	61	42	25	25	45	45	45	45	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryID			100	62	60	42	25	25	45	45	45	45	45	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryIE				85	62	42	25	25	45	45	45	45	45	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryIF					100	42	25	25	45	45	45	45	45	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryIG						100	25	25	41	41	41	41	41	37	37	37	25	30	30	30	30
Lep - Dip	CryIIA							100	92	25	25	25	25	25	25	25	25	40	25	25	25	25
	CryIIB								100	25	25	25	25	25	25	25	25	40	25	25	25	25
Coleópteros	CryIIIA									100	75	51	83	51	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryIIIB										100	51	75	51	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryIIIC											100	51	53	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryIIID												100	51	37	37	37	25	30	30	30	30
	CryIIIE													100	37	37	37	25	30	30	30	30
Dipteros	CryIVA														100	44	48	25	30	30	30	30
	CryIVB															100	44	25	30	30	30	30
	CryIVC																100	25	30	30	30	30
	CryIVD																	100	25	25	25	25

Adaptado de J. S. Felleison et al. 1992.

Los genes Cry II codifican para una proteína de 65 KDa, asociada a la formación de cristales de forma cuboidal. Se dividen en dos subgrupos, en donde el subgrupo Cry IIA es la proteína con actividad tóxica, tanto para lepidópteros como para dípteros; por su parte, el subgrupo Cry IIB es tóxico sólo para lepidópteros. Cabe señalar que las proteínas Cry II muestran una homología muy limitada con el resto de la familia de proteínas Cry de *B. thuringiensis* (16, 28).

En cuanto a los genes Cry III, éstos codifican para proteínas específicas contra coleópteros, los cuales se estructuran en forma de cristales romboidales. Y se dividen en cuatro subgrupos. La protoxina tiene un tamaño de 72 KDa, con excepción de la Cry IIIC cuyo peso alcanza los 129 KDa y su fracción tóxica liberada después de la proteólisis es de 66 KDa. Los genes de proteínas tipo Cry III presentan cierta homología con los genes Cry I y Cry IV en el dominio tóxico (16).

Los genes Cry IV codifican para proteínas específicas contra dípteros y se han dividido en cuatro subclases: la A y B tienen dominios similares a los genes Cry I y codifican para proteínas de 135 y 128 KDa, respectivamente, mismas que son proteolíticamente convertidas a péptidos tóxicos de 53 a 78 KDa. Los genes del subgrupo Cry IVC

codifican para proteínas de 78 KDa y los genes del subgrupo Cry IVD se relacionan con proteínas de 72 KDa. Una proteína Cry IV, se convierte generalmente en un péptido de 30 KDa. Y presenta una limitada homología con el resto de las  $\delta$ -endotoxinas, además de estructurarse formando cristales ovoides, (16, 13).

### **Estructura del gen Cry**

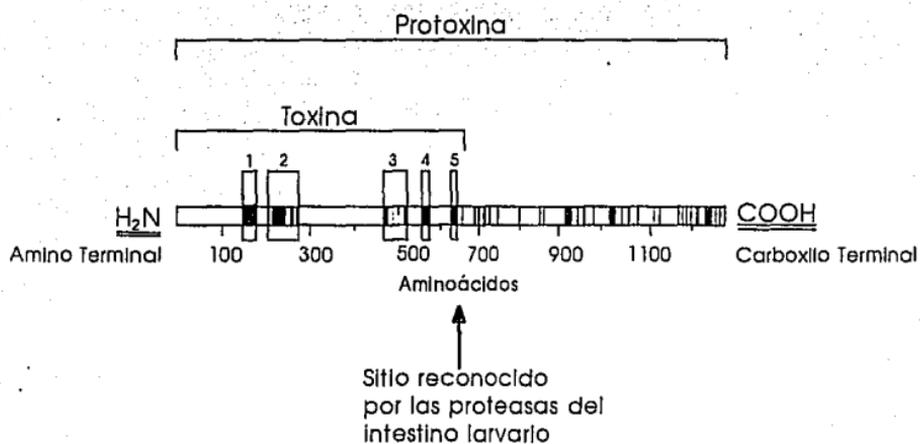
La estructura molecular del gen se divide básicamente en dos regiones, dependiendo del sitio de procesamiento de la protoxina. La región aminoterminal (de aproximadamente 650 residuos) es el fragmento tóxico, en tanto que la región carboxiloterminial no está relacionada con la toxicidad pero se le ha atribuido un papel importante en la formación y estabilidad de la estructura del cristal.

Los resultados de alineamiento de los diferentes genes Cry I muestran que existe una alta homología en la primera parte de la región terminal (del 1-280), seguida de una región hipervariable (residuos 280-650), a la cual se le ha aceptado un papel importante en la especificidad del producto del gen. Por último, varios estudios han demostrado que la

región carboxilo terminal está altamente conservada en los diversos genes Cry presentando homologías hasta de un 90%. Figura 1.

Finalmente, Sanchis encontró que en todos los genes de  $\delta$ -endotoxinas (Cry I, Cry II, Cry III y Cry IV), existen cinco regiones muy constantes dentro del fragmento tóxico y propuso que todos los genes involucrados podrían manifestar un mismo modo de acción (16, 28, 35).

FIGURA I



Esquema general del gen de  $\delta$ -endotoxina. (16).

Las líneas verticales representan aminoácidos conservados entre los diferentes genes Cry. Los cuadros enmarcan a los cinco bloques altamente conservados entre los genes Cry.

### **Organismos transformados con genes de $\delta$ -endotoxina**

El aislamiento de los genes que codifican para síntesis de  $\delta$ -endotoxina ha permitido su introducción a otros organismos y ello ha transformado a *B. thuringiensis* en una pieza importante dentro de la Ingeniería Genética, a través de la cual se han obtenido sistemas con grandes perspectivas, tales como los siguientes (4):

- a) Sistemas en donde la toxina se expresa constante y específicamente en varias plantas atacadas por los insectos.
- b) Sistemas en donde la toxina adquiere protección en contra de la degradación y, por lo tanto, se aumenta considerablemente su tiempo de permanencia en el ambiente.
- c) Sistemas que permiten una mayor distribución de la toxina en lugares tales como la raíz y la rizosfera, donde es difícil lograr la protección por insecticidas.
- d) Sistemas en los cuales se aprovecha la susceptibilidad de diversos insectos contra el ataque de ciertos virus, para aumentar la

eficiencia en la actividad insecticida de estos últimos.

### **Plantas transgénicas**

El desarrollo de la tecnología implicada para transferir genes de  $\delta$ -endotoxina al genoma vegetal, ha originado el sistema más eficiente para incrementar la distribución de la toxina de *B. thuringiensis* en el medio ambiente (4, 31, 32).

La metodología utilizada para insertar genes en plantas, involucra el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, un microorganismo del suelo que posee la capacidad de movilizar una porción de su propio DNA hacia el genoma del vegetal al que infecta.

Durante la década pasada, diferentes grupos desarrollaron la tecnología necesaria para introducir diferentes genes en células vegetales y recuperar plantas transgénicas a partir de células transformadas. Las plantas transgénicas resultantes incorporan los nuevos genes en su genoma, como característica estable y hereditaria (12, 31).

Sin embargo, esta tecnología de expresión de genes de *B. thuringiensis* en plantas, también presenta algunas desventajas o limitaciones, tal como se resume a continuación (12, 23, 31, 32).

**Ventajas:**

1. Economía
2. Seguridad ambiental
3. Efectividad específica

La economía lograda es muy importante, puesto que al expresarse la toxina constantemente en la planta, no es necesario aplicar insecticidas y por ello, los costos en el mantenimiento de los cultivos se reducen considerablemente.

La segunda ventaja consiste en que no ocurre daño sobre el medio ambiente, ya que la toxina está contenida dentro de la planta y, al no ser lavada por la lluvia, no se originan residuos en suelo y ríos; además, con este sistema también se protegen partes de la planta que antes eran casi imposibles de alcanzar con insecticidas esparcidos.

Finalmente, el sistema sólo ataca a los insectos parásitos de las plantas.

**Desventajas o limitaciones:**

1. Existen dificultades en la obtención de niveles de toxina lo suficientemente altos para matar a diferentes larvas. De hecho, se ha reportado que no todos los insectos son igualmente susceptibles a determinadas  $\delta$ -endotoxinas, por lo que una dosis baja podría no afectar a las plagas más tolerantes. Adicionalmente, el bajo espectro de acción de ciertas toxinas representa una gran desventaja.

2. El potencial desarrollo de insectos resistentes. Ello debe tomarse en consideración y estudiarse a mayor profundidad, ya que el futuro de las  $\delta$ -endotoxinas -como insecticidas- depende primordialmente de este aspecto.

3. Los cultivos que expresan síntesis de  $\delta$ -endotoxina involucran organismos transgénicos y, por lo tanto, el proceso de registro de este material para su comercialización es muy lento y costoso.

4. Aunque actualmente existe una gran cantidad de plantas que se transforman con genes de  $\delta$ -endotoxina, pero ninguna se ha liberado para su comercialización; se debe probar que la  $\delta$ -endotoxina no resulta

tóxica para el hombre o a otros animales.

### **Bacterias transgénicas receptoras de genes de $\delta$ -endotoxina**

Entre los microorganismos que se han logrado transformar vía los genes provenientes de *B. thuringiensis*, destacan las siguientes especies originarias del suelo: *Pseudomonas cepacea*, *P. fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bradirhizobium* sp y la bacteria endofita *Clavibacter xyli* subespecie *cynodotis*. Sin lugar a duda, el uso de estas bacterias transgénicas ha permitido extender el rango de distribución de la  $\delta$ -endotoxina en otros nichos ecológicos. Tal es el caso de *Clavibacter*, bacteria endófito que crece en el tejido vascular del maíz y de otras plantas, o el de *Pseudomonas* y *Agrobacterium*, las cuales desarrollan en la zona de la rizosfera y, el de *Bradirhizobium*, que además de reproducirse en esta última, coloniza las raíces estableciendo una relación simbiótica con la planta, formando nuevas estructuras denominadas nódulos; es dentro de éstos que la bacteria se reproduce y fija nitrógeno. En este sentido, se ha demostrado ampliamente que las cepas de *Bradirhizobium* que se transforman con el gen de  $\delta$ -endotoxina, producen nódulos resistentes al ataque de larvas de *Rivellia angulata*, ya que este insecto se alimenta de las zonas

noduladas y no del resto de la raíz (12, 22, 30, 35).

El empleo de otras bacterias como vehículos portadores de la proteína insecticida de *B. thuringiensis* ha resultado de gran relevancia, puesto que además de proveer constantemente de dicha proteína a las plantas, se obtiene una clara ventaja respecto al uso directo de *B. thuringiensis*: éste no sobrevive con regularidad en el suelo y su cristal suele inactivarse rápidamente en el ambiente por efecto de la luz ultravioleta de los rayos solares (24).

## CONCLUSIONES

1. *B. thuringiensis* ofrece grandes ventajas como insecticida, ya que no sólo presenta alta especificidad hacia el insecto "blanco" y ausencia de toxicidad para plantas, animales y humanos, sino que además no contamina el medio ambiente.

2. La  $\delta$  toxina de *B. thuringiensis* es notablemente más potente que numerosos pesticidas químicos.

3. Las plantas transgénicas representan el medio más efectivo y económico para distribuir la  $\delta$ -toxina, si bien deben establecerse normas y disposiciones precisas para lograr su futura liberación comercial.

**BIBIOGRAFIA**

1. Alcocer G.L.:  
EL COMBATE MICROBIOLOGICO DE ALGUNAS PLAGAS POR MEDIO DE  
AGENTES PATOGENOS PARA INSECTOS.  
Ed. Fitófilo XXI.  
México, 1968.
2. Alcocer G.L., and Gottwald C.: Posibilidades de producción en  
México de B. thuringiensis a nivel de planta piloto. VII Reunión  
Nacional de Control Biológico. Manzanillo Colima, México, 1980.
3. Aronson A.I., Beckman W., and Dunn P.: Bacillus thuringiensis and  
related Insect pathogenes, Microbiol. Rev., 1986; 50: 1-24.
4. Bartón K.A., Whiteley H.R., and Yang N.S.: Bacillus thuringiensis  $\delta$ -  
endotoxina expressed in transgenic Nicotina tabacum provides  
resistence to lepidopteran insects. Plant physiol, 1987; 85: 1103-  
1109.

5. Bravo A., Jansens S., and Peferoen M.: Immunocytochemical localization of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins in intoxicated insects, *J. Invertebr Pathol*, 1992; 60: en prensa.
  
6. Bulla L. A., Brechtel D.B., Krames K.J., Shethna Y.I., Y.I., Aronson A.I. and Fritz-James P.C.: Ultrastructure, Physiology and Biochemistry of Bacillus thuringiensis, *Crit. Rev. Microbiol.*, 1980; 8: 147-204.
  
7. Brian Y,H.I.:  
BACTERIOLOGIA  
C.E.C.S.A. 3era ed.  
México, 1976.
  
8. Brousseau R. and Masson L.: Bacillus thuringiensis Insecticidal crystal toxins; gene structure and mode of action, *Biotech. Adv*, 1988; 6: 697-724.
  
9. De Bach P.:  
CONTROL BIOLÓGICO DE LAS PLAGAS DE INSECTOS Y MALAS HIERBAS  
Ed. C.E.C.S.A., 2a ed.  
México, 1990.

10. Domínguez García-Tejero F.:  
PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS CULTIVADAS  
Ediciones Mundi-Prènsa, 8a. Ed.  
España, 1989.
  
11. FAO.: Resistencia de las plagas a los plaguicidas y evaluación de las pérdidas agrícolas. Tomo II. Informe de la tercera reunión del cuadro expertos de la FAO. Estudio, Producción y Protección vegetal.  
Roma, 1983.
  
12. FAO.: Importancia y potencial del Bacillus thuringiensis en el control de plagas.  
Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación.  
Santiago, Chile, 1993.
  
13. Feitelson J.S., Payne J., and Kim L.: Bacillus thuringiensis, Insects and Beyond, Biotechnology, 1992; 10: 271-275.

14. Ferre J., Real M.D., Van Rie J., Jansens S., and Peferoen M.: Resistance to the Bacillus thuringiensis bioinsecticide in a field population of Plutella xylostella is due to a change in a midgut membrane receptor, Proc. Natl. Acad. Sci., 1991; 88: 5119-5123.
15. Flores L.G.:  
Evaluación del Bacillus thuringiensis Berliner en el control del gusano rayado de la col Pieris rapae L.  
En Apodaca Nuevo León, México. Tesis. 1988.
16. Höfte H. and Whiteley H.R.: Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis, Microbiol Rev, 1989; 53:242-255.
17. Hofmann C., Vandrebreggen H., Höfte H., Van Rie J., Jansens S., and Van Nellar H.: Specificity of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts, Proc. Natl. Acad. Sci., 1988; 85: 7844-7848.
18. Li J., Carrall D. and Ellar D.J.: Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from Bacillus thuringiensis at 2.5 Å resolution, Nature,

- 1991; 353: 815-821.
19. Luthy P. and Ebersold H.R.: Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin: histopathological and molecular mode of action. In "Pathogenesis of invertebrate microbial diseases" E.W. Davidson, 1981; 235-267.
  20. Mac Gaughey W.H.: Insect resistance to the biological insecticide Bacillus thuringiensis, Science, 1985; 229: 193-195.
  21. Martens J.W.M., Honee G., Zuidema D., Van Lent J.W.M., Visser B. and Vlak J.M.: Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells, Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56: 2764-2770.
  22. Obukowicz M.G., Perlak F.J., Kusano Kretzmer K., Mayer E.J. and Watrud L.S.: Integration of the  $\delta$ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis into the chromosome of root colonizing strains of Pseudomonas using. Tn 5, Gene, 1986; 45: 327-331.
  23. Perlak F.J., Fuchs R.L., Dean D.A., McPherson S.L. and Fischhoff D.A.: Modification of the coding sequence enhances plant expression

of insect control protein genes, Proc. Natl. Acad. Sci., 1991; 88: 3324-3328.

24. Puzsai M., Fast P., Gringorten L., Kaplan H., Lessard T. and Carey P.R.: The mechanism of sunlight-mediated inactivation of Bacillus thuringiensis crystals, Biochem. J., 1991; 273: 43-47.
25. Rimmington A.: The production and use of microbial pesticides in the USSR, Int. Ind Biotechnol, 1989; 9: 10-14.
26. Rowe E.G. and Margaritis A.: Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by Bacillus thuringiensis. CRC Crit Rev Biotechnol, 1987; 6: 87-127.
27. Sacchi V.F., Parenti P., Hanozet G.M., Giordana B., Luthy P. and Wolfersberger M.G.: Bacillus thuringiensis toxin inhibits Pieris brassicae midgut cells, FEBS, 1986; 204: 213-218.
28. Shnepf H.E. and Whiteley H.R.: Delineation of a toxin-encoding segment of a Bacillus thuringiensis crystal protein gene, J. Biol. Chem., 1985; 260: 6273-6280.

29. Slatin S.L., Abrams C.K. and English L.:  $\delta$ -endotoxina formation selective channels in planar lipid bilayers, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1990; 169: 765-772.
30. Stock C.A., McLoughlin T.J., Kleen J.A. and Adang M.J.: Expression of a Bacillus thuringiensis crystal protein gene in Pseudomonas cepacia, *Can. J. Microbiol.*, 1990; 36: 879-884.
31. Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H. Jansens S., De Beuckeleer M., Deal C., Zabeau M., Van Montagu M. and Leemans J.: Transgenic plants protected from insect attack, *Nature*, 1987; 328: 33-37.
32. Van Rie J.: Insect control with transgenic plants resistance proof, *Tibtech*, 1991; 9: 177-179.
33. Van Rie J., Jansens S., Höfte H. Degheele D. and Mellaert H.: Receptores on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxina, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990; 56: 1378-1385.

34. Van Rie J., Mac Gaughey W.H. Jhonson D.E., Barnett B.D. and Van Mellart H.: Mechanism of Insect resistance to the microbial insecticide Bacillus thuringiensis, Science, 1990; 247: 72-74.
35. Wabiko H., Heid G.A. and Bulla L.A.: Only part of the protoxin gene of Bacillus thuringiensis subs berliner 1715 is necessary for insecticidal activity, Appl. Environ. Microbiol., 1991; 49: 706-708.
36. Wolfersberger M.G.: The toxicity of two Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins, Experientia, 1990; 46: 475-477.
37. Zafaryab M. and Ellar D.J.: Mechanism of action of Bacillus thuringiensis insecticidal  $\delta$ -endotoxin interaction with phospholipids vesicles, Biochim. Biophys. Acta., 1988; 978: 216-222.