



Boletín de la Sociedad Española de Entomología Aplicada

SUMARIO

EDITORES

Alejandro Tena

Pablo Bielza

EDITOR DOSSIER

Juan Ferré

FOTO PORTADA

Foto ganadora concurso SEEA

Nuria Agustí

MAQUETACIÓN

Ediciones y Promociones L.A.V., S.L.

ISSN 2603-6754



**SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
ENTOMOLOGÍA APLICADA**

SEDE CENTRAL DE LA SEEA

Unidad de Protección de Cultivos

E. T. S. I. Agrónomos

28040 Madrid

CONTACTO

✉ mgnunez@inia.es

✉ luis.glopez@upm.es

🌐 www.seea.es

🐦 Twitter: @SEEA_entomol

- 4 Nota del Presidente.** Pablo Bielza.
- 5 Entrevistas a socios ilustres:** José Manuel Llorens. Por Pablo Bielza.
- 9 Revisión de interés:** *Bacillus thuringiensis* (Bt): un valioso recurso para el control de plagas. Por Juan Ferré.
- 10 *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas:**
- 10** *Bacillus thuringiensis* se hace mayor, más de medio siglo como alternativa a los insecticidas de síntesis. Por V. Areco, C. Peralta y L. Palma.
- 18** Diversidad de las proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis*. Por J. Gomis-Cebolla.
- 26** Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. Por D. Pinos y P. Hernández-Martínez.
- 31** Compuestos sinergistas con las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Por A. Andrés Garrido y B. Escriche.
- 36** Resistencia a las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. Por J. Ferré.
- 41** Obtención de colecciones de *Bacillus thuringiensis* para el descubrimiento de nuevas cepas y nuevas proteínas con actividad insecticida. Por A. Khorramnejad, B. Escriche y Y. Bel.
- 47** Cultivos Bt: una tecnología con historia y futuro. Por C. Novillo y Rocío Fernández Cantón.
- 52** Resistencia de las plagas al maíz Bt: estado actual y planes de seguimiento en España. Por G. P. Farinós y F. Ortego.
- 58 Entrevista a entomólogos de otras sociedades:** Xavier Bellés. Por Meritxell Pérez-Hedo y Salvador Herrero.
- 60 Presentación Congreso SEEA 2019 en Madrid.** Por Comité Organizador Congreso.
- 63 Entomólogos por el mundo:** entrevista a Ana Pineda (Wageningen University). Por Saioa Legarrea (Amsterdam University).
- 67 Herramientas para entomólogos:** Cómo sobrevivir a R: análisis de supervivencia con R. Por Miguel Calvo Agudo y César Monzó.
- 71 Sección de fotografía.** Selección por Marcos Miñarro.
- 73 Chiste entomológico.** Selección por Luis Miguel Torres.



***Bacillus thuringiensis* se hace mayor, más de medio siglo como alternativa a los insecticidas de síntesis**

Vanessa Areco¹, Cecilia Peralta¹ y Leopoldo Palma^{1,2}

¹Centro de Investigaciones y Transferencia (CITVM-CONICET), Universidad Nacional de Villa María, Av. Arturo Jaureche 1555 (5900) Villa María, Córdoba, Argentina.

²Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas (IAPCByA), Universidad Nacional de Villa María (UNVM), 5900 Villa María, Argentina. E-mail: palma.leopoldo@gmail.com

RESUMEN

Las pérdidas económicas causadas en la agricultura por las plagas de insectos han servido de inspiración para el desarrollo de distintos métodos diseñados para combatirlos. Con los primeros insecticidas químicos de síntesis se lograba una reducción sustancial de los daños causados por estos insectos perjudiciales, pero con la consecuente contaminación de los agroecosistemas. Surgió entonces la necesidad de contar con métodos eficientes para el control de plagas agrícolas y que, a su vez, éstos fueran más amigables con el medio ambiente. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria gram positiva y esporulante, capaz de producir, durante la fase de esporulación y de crecimiento vegetativo, una serie de proteínas con actividad tóxica contra insectos de importancia agronómica. Esta bacteria y sus toxinas han formado parte de la materia activa de formulados bioinsecticidas desde el año 1928, comercializándose por primera vez en el año 1938 en Francia. Más tarde, hacia la década de los 90, los genes de estas toxinas fueron introducidos en plantas transgénicas, otorgándoles resistencia a los insectos plaga y revolucionando así a la agricultura moderna. De esta manera, Bt se ha convertido en el insecticida ecológico por excelencia demostrando su eficacia e inocuidad por ya más de 60 años.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus thuringiensis*, insectos plaga, control biológico, bioinsecticida

INTRODUCCIÓN

Desde hace aproximadamente 10.000 años el ser humano ya realizaba los primeros intentos de cultivar semillas para la obtención de su alimento, dando así origen a la agricultura (Mazoyer y Roudart, 2006). Desde ese entonces, los daños y pérdidas ocasionados por los insectos plaga han servido de inspiración para el desarrollo de distintas herramientas destinadas a prevenirlos o a controlarlos.

La química orgánica de síntesis mediante el desarrollo de insecticidas organoclorados como el DDT (dicloro difenil tricloroetano), fueron la gran promesa que garantizaba en ese entonces, una producción agrícola libre de plagas. Sin embargo, debido a su amplia y desmedida utilización, los insecticidas de síntesis comenzaron a perder eficacia contra las plagas por el desarrollo de resistencia. Por ejemplo, luego de finalizada la segunda guerra mundial, el DDT comenzó a utilizarse contra *Cydia pomonella* (Lepidoptera) y tan sólo unos años después, esta especie ya se había vuelto resistente (Weddle *et al.*, 2009). Poco más tarde, en el año 1960, la utilización del DDT era prohibida por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (EPA) debido a su demostrada pérdida de eficacia, su alta persistencia en el medioambiente y su elevada toxicidad hacia organismos no diana (www.epa.gov). Le sustituyeron entonces otros plaguicidas (organofosforados,

carbonatados, etc.), algunos de los cuales resultaban incluso más tóxicos que el propio DDT (Carson, 2002).

Sin embargo, la naturaleza una vez más demostró la existencia del principio Darwiniano de selección natural y su concepto de la supervivencia del más apto (Carson, 2002). Las poblaciones de insectos quedaban expuestas de manera reiterada a presiones de selección que inducían la generación de resistencia a los nuevos insecticidas (Whalon *et al.*, 2008). Este problema demandaba entonces la utilización de dosis cada vez más elevadas, una mayor frecuencia de aplicaciones o la creación de nuevas variantes con diferentes modos de acción. Como resultado, se producía una contaminación continua de los agroecosistemas poniéndose en riesgo la salud del hombre, los animales y de otros insectos no diana (ej. polinizadores) (Peralta y Palma, 2017).

De esta manera, surgió la necesidad de contar con alternativas más sustentables que permitieran controlar las plagas de una forma más amigable con el medio ambiente. La solución, en parte, se logró mediante la utilización de los insecticidas biológicos, también denominados bioinsecticidas o insecticidas ecológicos. Los bioinsecticidas ocupan actualmente un lugar relevante en la agricultura moderna ya que permiten llevar a cabo un control de plagas sustentable. Entre las ventajas más relevantes podemos citar que 1) son



biodegradables y no contaminan los ecosistemas, 2) son altamente específicos y no afectan a organismos no diana, 3) su aplicación no está sujeta a plazos de seguridad y 4) pueden ser incluidos en programas de manejo integrado de plagas (programas de control de plagas donde se utilizan todas las herramientas disponibles). Su utilización permite entonces reducir las dosis o el número de aplicaciones de insecticidas de síntesis, manteniendo igualmente las plagas por debajo de el umbral de daño económico (Mehrotra *et al.*, 2017). Entre las desventajas, podemos decir que éstas están dadas principalmente por su biodegradabilidad, su especificidad y su modo de acción. Por su biodegradabilidad, los bioinsecticidas pueden presentar un efecto residual más reducido en campo debido a la acción de factores abióticos. También poseen, por su especificidad y su modo de acción, un rango de especies susceptibles más acotado al compararse con los insecticidas químicos de amplio espectro (Ruiu, 2018).

En la agricultura moderna, existen una amplia variedad de productos biológicos compuestos por distintos microorganismos patógenos de insectos (virus, bacterias, protozoos, hongos y nemátodos), como así también enemigos naturales de las plagas que pueden ser utilizados eficientemente para el control de insectos perjudiciales en la agricultura (Frank, 2009). Destaca de entre todos éstos, la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner, 1915). Esta bacteria ha sido el agente bacteriano más utilizado en el control biológico de plagas durante los últimos 60 años, demostrando así su eficacia y seguridad para el medio ambiente, los animales y el ser humano (Peralta y Palma, 2017). Bt es una bacteria gram positiva, aeróbica y esporulante, capaz de sintetizar, durante la fase de esporulación de su ciclo de vida (**Figura 1**), unas inclusiones cristalinas proteicas adyacentes a la spora, con actividad tóxica contra una amplia variedad de insectos plaga y mosquitos vectores de enfermedades (Palma *et al.*, 2014). Las primeras en ser descubiertas han sido denominadas proteínas o toxinas Cry (por el cristal paraesporal) (Schnepf *et al.*, 1998). Adicionalmente, en el año 1996, se describieron otras proteínas insecticidas diferentes producidas durante la fase vegetativa de crecimiento de esta bacteria. Estas proteínas fueron denominadas proteínas insecticidas vegetativas o proteínas Vip (Estruch *et al.*, 1996).

A pesar de su creciente interés por su mercado potencial insecticida, las formulaciones de Bt no alcanzaron en su momento los niveles esperados de producción y comercialización por dos razones principales: la primera, debido a la gran aceptación que tuvieron los insecticidas de síntesis desde su descubrimiento y, la

segunda, al estallido de la segunda guerra mundial (Sanchis, 2011).

En contraposición, las plantas transgénicas Bt resistentes a los insectos han gozado desde el principio de una muy buena aceptación por parte de los productores agrícolas, llegando a reemplazar en algunos casos a los insecticidas convencionales y afianzando a Bt y sus toxinas como el insecticida ecológico por excelencia..

RESEÑA HISTÓRICA

Esta bacteria fue realmente descubierta en Japón en el año 1901 por el biólogo japonés Shigetane Ishiwata, quien

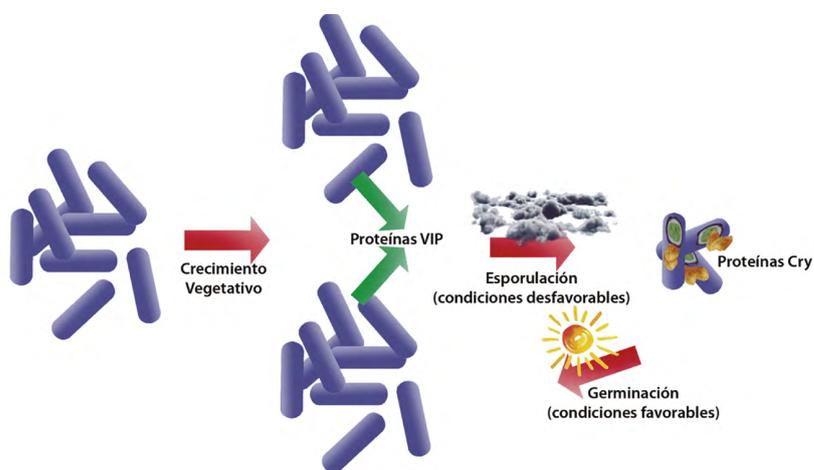


Figura 1. Ciclo biológico de Bt y producción de proteínas insecticidas durante la fase de crecimiento vegetativo (proteínas Vip) y la fase de esporulación (proteínas Cry).

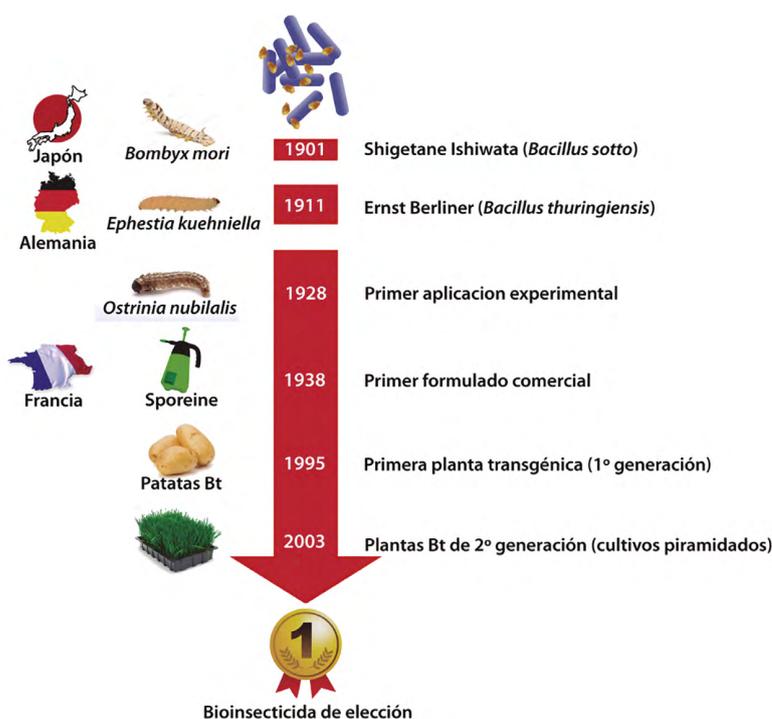


Figura 2. Historia del descubrimiento, desarrollo y evolución de Bt como bioinsecticida.



la denominó *Bacillus sotto* (**Figura 2**) y la describió como el agente causal de un tipo de enfermedad observada en el gusano de seda *Bombyx mori* (Lepidoptera) (Ishiwata, 1901). Sin embargo, dicho hallazgo fue publicado en el idioma japonés, pasando prácticamente inadvertido para los patólogos de insectos de la época (Jurat-Fuentes y Jackson, 2012). Ishiwata, también propuso que la patogenicidad podía deberse a la producción de toxinas insecticidas, al percatarse de que las larvas afectadas resultaban rápidamente paralizadas, de manera previa, a la propagación del bacilo (Ishiwata, 1905). No fue hasta 1911, cuando el científico Ernst Berliner realsó la bacteria de larvas infectadas de *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera) y la clasificó formalmente como *Bacillus thuringiensis*, en honor a que su hallazgo se produjo en la provincia alemana de Turingia (Berliner, 1915). Fue Berliner quien observó, además, la presencia de ciertas inclusiones cristalinas próximas a la espora, las cuales fueron descritas posteriormente de poseer solubilidad en el tracto alcalino de los insectos y ser responsables de la toxicidad (Jurat-Fuentes y Jackson, 2012). Más tarde, en 1928, Bt fue utilizado por primera vez con el objetivo de combatir plagas de los cultivos, en este caso, contra *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) (Husz, 1928).

Estos hallazgos, en su conjunto, concibieron la idea de aprovechar el potencial insecticida de esta bacteria para la producción de formulados para su comercialización. Fue así entonces que, a pesar de que los principios responsables de la actividad insecticida de esta bacteria no habían sido aún completamente elucidados, se produce en el año 1938 el primer insecticida Bt en Francia, registrado y comercializado bajo el nombre de "Sporeine". Este formulado, básicamente compuesto por una mezcla de cristales paraesporales y esporas, se utilizó inicialmente contra la polilla de la harina *Plodia interpunctella* (Lepidoptera). Posteriormente, Angus describió la relación que existía entre la actividad insecticida de Bt y la presencia de cristales parasporales (Angus, 1954). Casi en paralelo, las contribuciones de Hannay y Fitz-James permitieron determinar que los cristales paraesporales eran de naturaleza proteica (Hannay y Fitz-James, 1955). González *et al.* (1981) describieron, además, la presencia de ciertos plásmidos en el genoma de Bt como los responsables de la capacidad para producir cristales paraesporales, atribuyendo su síntesis a ciertos genes codificados en dichos plásmidos (González *et al.*, 1981).

Ese mismo año, se describe por primera vez el clonado y expresión de la primera proteína Cry recombinante en *Escherichia coli*, hito obtenido por Schnepf y Whiteley (1981). El gen *cry* provenía de Bt serovar *kurstaki* HD-1, y la actividad insecticida de los productos recombinantes fue probada exitosamente contra larvas del gusano del tabaco, *Manduca sexta* (Lepidoptera). Las proteínas recombinantes demostraron poseer la misma actividad tóxica que la de los cristales insecticidas producidos por la cepa Bt original (Schnepf y Whiteley, 1981). La producción de la primera proteína Cry recombinante en *E. coli* motivó entonces la realización de nuevos estudios con el objeto de llevar a cabo el

clonado y la expresión de estos genes en cultivos vegetales y que éstos adquieran, entonces, resistencia a las plagas agrícolas susceptibles. Sin embargo, los resultados obtenidos inicialmente no fueron particularmente alentadores, debido a que la expresión *in planta* del gen *cry* completo mostraba toxicidad en las plantas experimentales, además de una expresión deficiente que no brindaba una protección importante contra las plagas. Posteriormente se realizaron ensayos utilizando sólo un fragmento optimizado del gen *cry* y se adaptó, además, la secuencia codificante a la genética del vegetal. Tales modificaciones permitieron, por primera vez, la obtención de plantas transgénicas experimentales con altos niveles de expresión de la toxina y excelente protección en tabaco contra *M. sexta* y *Heliothis virescens* (Lepidoptera) (Carozzi *et al.*, 1992) y contra *O. nubilalis* en maíz (Warren *et al.*, 1992, Castagnola y Jurat-Fuentes, 2012).

Así fue que se produjo la primera planta de patata transgénica en el año 1995, la cual fue comercializada por NatureMark (Monsanto) bajo el nombre de NewLeaf. A partir de este momento, se construyeron también plantas de maíz y algodón Bt. Esta primera generación de cultivos transgénicos tenían en común que expresaban un único gen *cry* (**Tabla 1**) (Castagnola y Jurat-Fuentes, 2012). Su éxito fue, sin duda, rotundo, y marcó el inicio de una nueva era en la agricultura moderna. Sin embargo, la expresión de un solo gen Bt y su utilización masiva y continuada por varios años, más la ausencia de medidas correctas de contención (rotación de cultivos, uso de refugios no transgénicos, etc.), favorecieron la aparición de especies resistentes (Moar *et al.*, 2008).

Por ejemplo, en el año 1999 ya se describía resistencia en algodón Bt expresando la toxina Cry1Ac contra *Helicoverpa zea* (Lepidoptera) (Luttrell *et al.*, 1999, Tabashnik *et al.*, 2009). Otros eventos de resistencia fueron descritos más tarde en maíz Bt de primera generación, expresando las toxinas Cry1Ab, Cry1Fa y Cry3Bb en *Busseola fusca* (Lepidoptera), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) y *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera), respectivamente (Carrière *et al.*, 2016).

Tabla 1. Resumen de las toxinas Cry más utilizadas en plantas transgénicas Bt (Castagnola & Jurat-Fuentes, 2012, Carrière *et al.*, 2015).

1ª Generación	2ª Generación	3ª Generación
Cry1Ab	Cry1Ab + Cry1Fa	Piramidados
Cry1Ac	Cry1Ab + Vip3Aa	Piramidados + RNAi
Cry1Fa	Cry1Ab + Cry1Fa + Vip3Aa	
Cry3A	Cry1A.105+ Cry2Ab	
mCry3A	Cry1A.105 + Cry1Fa + Cry2Ab	
Cry9C	Cry1Ac+ Cry2Ab	
	Cry1Ac+ Cry1Fa	
	mCry1Ab+ Vip3A	
	Cry1Ab+ Cry2Ae	
	Cry1Ac+ Cry1Fa + Vip3Aa	
mCry1Ab: Cry1Ab modificada		



En 2005, la detección de una susceptibilidad reducida y temprana a la toxina Cry2Ab en algodón en *H. armigera* hizo sospechar, además, la posibilidad de existencia de resistencia múltiple a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab (Tabashnik *et al.*, 2009).

Estos problemas de resistencia a los cultivos Bt de primera generación motivó entonces el diseño y evolución de los mismos a cultivos Bt de segunda generación o cultivos piramidados (Tabla 1), los cuales fueron diseñados para expresar, al menos, dos genes Bt activos contra la misma especie. Se pretendía, entonces, que esta estrategia permitiera abolir o retrasar de manera eficiente la aparición de resistencias al combatir a las plagas con dos toxinas distintas (Welch *et al.*, 2015).

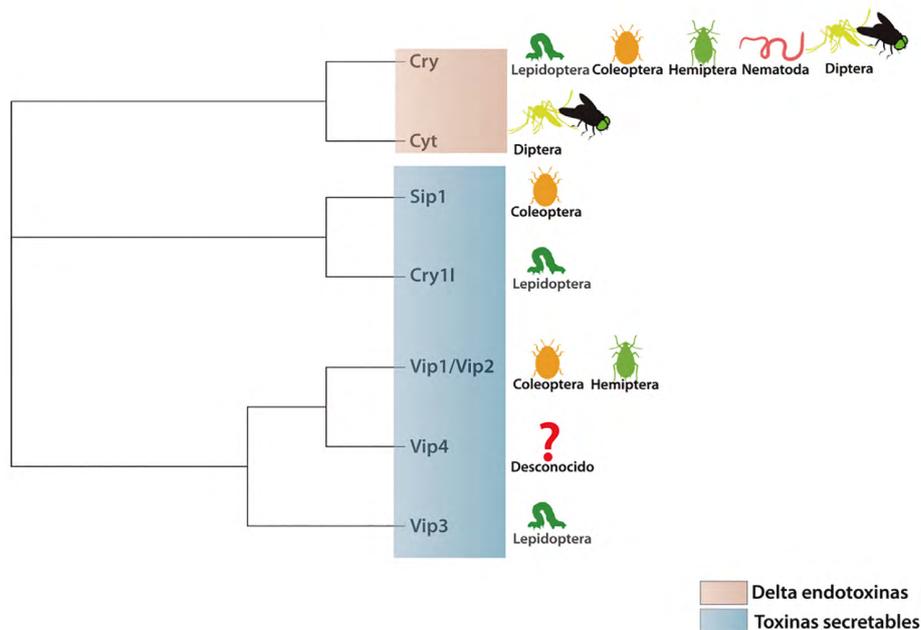
Sin embargo, la altamente conservada estructura proteica de algunas toxinas favoreció la generación de resistencia cruzada entre las mismas, por lo que comenzaron también a describirse eventos de resistencia hacia los cultivos Bt de segunda generación (Tabashnik *et al.*, 2013, Welch *et al.*, 2015). Es así que se concibe la idea del desarrollo de plantas Bt de tercera generación, las cuales deberían ser capaces, no sólo de controlar las plagas, sino también de combatir de manera temprana los problemas de resistencia (Castagnola y Jurat-Fuentes, 2012). Estos cultivos se encuentran actualmente en fase experimental y han sido diseñados para expresar genes Bt piramidados con actividad contra plagas de coleópteros y lepidópteros, o mediante la combinación de éstos con tecnologías alternativas de control de insectos, como el de la interferencia de ácidos ribonucleicos (ARNi). El objetivo de esta tecnología del ARNi es interferir con la expresión de genes específicos del insecto para reducir o inhibir la síntesis de proteínas esenciales de las plagas, sin afectar a otros organismos no diana (Ni *et al.*, 2017).

De esta manera, y mas allá de los problemas de resistencias, Bt sigue siendo hoy en día el bioinsecticida de elección, no sólo para llevar a cabo un control de plagas sostenible en la agricultura, sino también para llevar a cabo el desarrollo de métodos de control más evolucionados basados en el gran potencial insecticida natural de esta bacteria

PROTEÍNAS INSECTICIDAS Bt

Como ya se mencionara anteriormente, Bt produce, durante su ciclo de vida, diferentes proteínas, las cuales han recibido una significativa atención debido a su capacidad para ser utilizadas en el control biológico de plagas agrícolas. En la fase de esporulación, Bt produce cristales parasporales ricos en proteínas Cry (por cristal) y Cyt (por citolíticas), también denominadas conjuntamente δ -endotoxinas (Figura 3). Estas δ -endotoxinas en su conjunto (se han descrito más de 700) han demostrado poseer actividad tóxica contra un amplio rango de insectos de diferentes órdenes y contra nemátodos (van Frankenhuyzen, 2009, van Frankenhuyzen, 2013).

Durante la fase vegetativa de crecimiento se producen y secretan al medio de cultivo las proteínas Vip (por *vegetative insecticidal protein*), con actividad insecticida contra coleópteros (toxinas binarias Vip1/Vip2) y lepidópteros (toxinas Vip3) (Chakroun *et al.*, 2016). En 2010 se informa de la existencia de un cuarto miembro de la familia de proteínas Vip (toxina Vip4), a pesar de que no se ha publicado aún ningún dato de su actividad o de su espectro insecticida (Crickmore *et al.*, 2019). Por último, también se ha descrito una proteína secretable adicional, con actividad insecticida contra coleópteros. Esta proteína no posee similitud con las proteínas Vip y ha sido denominada SIP (por *secreted insecticidal protein*) (Donovan *et al.*, 2006) (Figura 3).



MODO DE ACCIÓN

En lo que respecta a las toxinas Cry, la mayoría de ellas, y las más estudiadas, se corresponden a la familia conocida como proteínas Cry de 3 dominios, por un conjunto de 3 secuencias aminoacídicas conservadas que constituyen los dominios amino terminal o de perforación, central, y carboxilo terminal. Estos tres dominios poseen roles clave responsables de la actividad insecticida de estas proteínas (Figura 4). El dominio amino terminal (I) participa de la formación del poro, el dominio central (II) participa en las interacciones toxina-receptor mientras que el dominio carboxilo terminal (III) colaboraría con los dominios anteriores en la unión de la toxina al receptor y en la formación del poro (Palma *et al.*, 2014).

Figura 3. Esquema resumido del espectro de acción conocido de toxinas Bt sobre especies de invertebrados. Las toxinas Cry1I son particularmente producidas durante la fase vegetativa de crecimiento y secretadas al medio (Ruiz de Escudero *et al.*, 2006).



Su modo de acción ha sido descrito, principalmente, para especies de insectos lepidópteros (**Figura 5**). La intoxicación del insecto comienza con la ingestión y solubilización de los cristales proteicos en el pH alcalino del intestino del insecto, luego se produce el procesamiento proteolítico o activación de la protoxina inactiva a toxina activa, por enzimas digestivas intestinales (proteasas). La toxina es ahora capaz de unirse a receptores específicos localizados en las células del epitelio intestinal, insertándose a través de interacciones producidas con su receptor o receptores, lo cual lleva a la formación de poros líticos en la membrana celular. Como resultado se produce la lisis de las células epiteliales y destrucción del epitelio intestinal (Bravo *et al.*, 2007). La muerte es causada entonces por inanición, ya que el insecto es incapaz de asimilar los alimentos que ha ingerido, sufre parálisis intestinal y, por ende, cesa de alimentarse. Alternativamente, las esporas ingeridas pueden encontrar un ambiente favorable para su germinación, entrando en fase de crecimiento vegetativo y rematando a las larvas moribundas por la generación de septicemia generalizada (Peralta y Palma, 2017).

Estudios realizados sobre los daños causados por las toxinas Vip3 sobre el epitelio intestinal indicarían una patología celular similar, en donde la toxina activada por proteasas intestinales se uniría a receptores diferentes a los utilizados por las toxinas Cry (Lee *et al.*, 2003), permitiendo la utilización conjunta de toxinas Cry y Vip3 en cultivos transgénicos de segunda generación (Sena *et al.*, 2009).

En cuanto a las toxinas binarias Vip1/Vip2 y las toxinas Cyt, sus mecanismos de acción no están aún completamente elucidados. Sin embargo, se estima que la proteína Vip1 se uniría a receptores celulares específicos facilitando la entrada de la toxina Vip2 a la célula, la cual, por su similitud con otras

toxinas ADP-ribosilantes bacterianas, produciría una alteración de la actina y destrucción del citoesqueleto celular (Chakroun *et al.*, 2016). Para las toxinas Cyt se han postulado dos modos de acción diferentes, uno se produciría por un efecto de tipo detergente sobre los lípidos de la membrana celular, mientras que el otro sería por formación de poros en la membrana celular (Soberón *et al.*, 2013).

CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INSECTICIDAS Bt

Desde que se descubriera la primera proteína Cry, se han descrito actualmente más de 700 variantes divididas en 78 subfamilias (ej. de Cry1 a Cry78), más de 38 proteínas Cyt divididas en 3 subfamilias (Cyt1, Cyt2 y Cyt3), y aproximadamente 150 proteínas Vip divididas en 4 subfamilias (Vip1, Vip2, Vip3 y Vip4) (Crickmore *et al.*, 2019). El descubrimiento continuo y creciente de una amplia variedad de toxinas Cry demandaba entonces la creación de un sistema de nomenclatura que permitiera clasificarlas de manera ordenada. El sistema de clasificación de estas toxinas fue diseñado y propuesto por el Comité de Nomenclatura de Toxinas Bt, el cual se basó en el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de cada proteína (Crickmore *et al.*, 1998). De esta manera, cuando una nueva toxina Bt es descubierta, se le asigna un nombre al compararse con su homólogo más cercano. Su nombre comenzará entonces con el prefijo Cry, Cyt o Vip (según corresponda) seguido por cuatro rangos jerárquicos basados en un número arábigo, una letra mayúscula, una letra minúscula y, finalmente, otro número arábigo (ej. Cry1Aa1). Las proteínas insecticidas que muestren menos de un 45% de homología en su secuencia de aminoácidos diferirán en el rango primario, con menos de un 78% diferirán en el rango secundario y, finalmente, con menos de un 95% de identidad, diferirán en el rango terciario (Palma *et al.*, 2014). Las proteínas con porcentaje de identidad mayor al 95% se diferenciarán por un cambio en el rango cuaternario (ej. Cry1Aa1, Cry1Aa2, Cry1Aa3, etc.) (Chakroun *et al.*, 2016) (**Figura 6**).

CEPAS INSECTICIDAS

Hasta el año 1976 se creía que Bt poseía un espectro insecticida restringido o conservado a larvas de lepidópteros. Las cepas más utilizadas contra especies de lepidópteros han

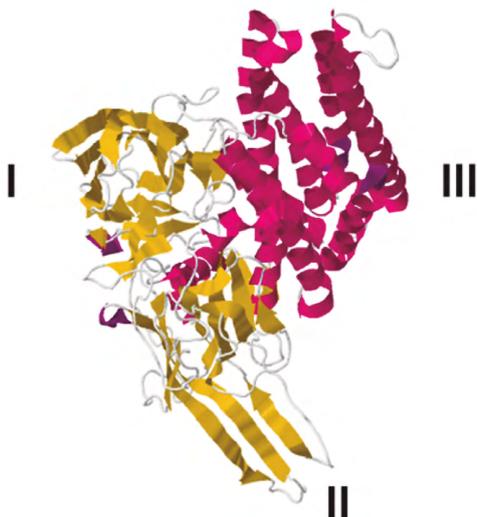


Figura 4. Estructura tridimensional de la toxina Bt Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001). Los números romanos indican los tres dominios conservados típicos: (I), dominio amino terminal o de perforación; (II), dominio central responsable de las interacciones toxina-receptor y (III), dominio carboxilo terminal que participa en la unión de la toxina al receptor y en la formación del poro.

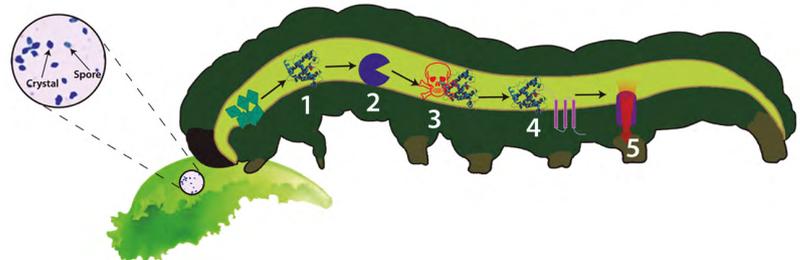


Figura 5. Modo de acción de las toxinas Cry de Bt en lepidópteros, adaptado de Peralta y Palma (2017). 1) Ingestión del cristal, solubilización y protoxina soluble libre en el intestino; 2) activación de la protoxina por proteólisis; 3) toxina activada libre en el intestino; 4) toxina que se une a los receptores celulares y 5) formación de poros, desequilibrio osmótico y lisis celular (Peralta y Palma, 2017).



Figura 6. Sistema de nomenclatura y clasificación de toxinas Bt propuesto por el Comité de Nomenclatura (Crickmore *et al.*, 1998). En color rojo se detalla el carácter del rango que varía y en verde el que se mantiene, según el porcentaje de similitud que posee una toxina nueva al compararse con su homólogo más cercano.

sido desde ese entonces, las cepas de Bt serovar *kurstaki*, Bt serovar *aizawai* y Bt serovar *galleriae* (Glare *et al.*, 2017). Sin embargo, el interesante potencial insecticida de esta bacteria motivó en su momento a organizaciones tanto públicas como privadas a la realización de extensivos programas de búsqueda y aislamiento de nuevas cepas Bt, que pudieran exhibir un espectro insecticida diferente o más amplio. Fue así que Goldberg y Margalit (1977) describieron en Israel una nueva cepa con actividad tóxica contra dípteros, correspondiéndose esta cepa a la variedad Bt serovar *israelensis* (Goldberg y Margalit, 1977). Más tarde, en Alemania, Krieg *et al.*, (1987) aislaron del gusano de la harina, *Tenebrio molitor* (Coleoptera), una cepa de Bt tóxica contra larvas de coleópteros a la que denominaron Bt serovar *tenebrionis* (Krieg *et al.*, 1987).

De esta manera, hacia la década de los 90 se estimaba que se habría realizado el aislamiento y caracterización de aproximadamente 40.000 cepas Bt en todo el mundo (Lambert y Perferoen, 1992). Estas cepas Bt se han ido clasificando en 85 serovares o subespecies mediante la utilización de un método de diagnóstico serológico del antígeno flagelar H (Glare *et al.*, 2017).

Actualmente, los formulados Bt son utilizados principalmente para el control de insectos plaga del orden Lepidoptera, comercializados bajo distintos nombres (ej. Thuricide, XenTari, Delfin, etc.). Sin embargo, y gracias a la demostrada toxicidad causada por Bt contra diferentes especies de invertebrados, se ha conseguido extender la producción y comercialización de productos que resultan activos contra especies de coleópteros plaga (ej. Novodor) y mosquitos vectores de enfermedades (ej. VectoGreen, Mosquito Dunk, etc.). Sin embargo, y mas allá de sus distintos nombres comerciales, en todos ellos se siguen utilizando las cinco serovares descritos anteriormente (Glare *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Ya sea por la aplicación de formulados en los cultivos o mediante la siembra y producción de variedades transgénicas resistentes a los insectos, Bt se ha posicionado actualmente como el bioinsecticida microbiano más utilizado en la agricultura moderna a nivel mundial, demostrado así su efectividad e inocuidad durante al menos los últimos 60 años.

Históricamente, el productor agrícola ha preferido la utilización de insecticidas químicos de amplio espectro. Esta preferencia ha ido cambiando a favor de métodos sostenibles gracias a las normativas vigentes que regulan la utilización de estos insecticidas, la conciencia pública generada sobre los efectos

secundarios de los mismos sobre la salud de las personas y a la disponibilidad de bioinsecticidas cada vez más eficientes. Esta tendencia ha permitido llevar a cabo una reducción sustancial en los niveles de insecticidas, entre otros agroquímicos, que se aplican en los agroecosistemas. De hecho, en algunos casos, se ha conseguido reemplazar a los insecticidas de síntesis por cultivos transgénicos Bt resistentes a los insectos.

Sin embargo, su uso continuado y muchas veces incorrecto, sumado a la remarcable capacidad de los insectos para superar la presión de selección ejercida por los insecticidas Bt, ha puesto muchas veces en entredicho a la eficacia de esta bacteria.

El creciente número y variedad de toxinas Bt descritas actualmente en innumerables trabajos científicos realizados en todo el mundo demuestran una elevada variabilidad genética en Bt, la cual sería responsable de su alta capacidad para producir nuevas toxinas. Es este concepto el que incentiva actualmente a investigadores, tanto públicos como privados, para continuar con el aislamiento y caracterización de cepas Bt con el objeto de preservar el potencial insecticida de este invaluable recurso biológico.





BIBLIOGRAFÍA

Angus TA. 1954. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature* 173: 545-546.

Berliner E. 1915. Über die schlafsucht der mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella*, Zell.) und ihren erreger *B. thuringiensis* n. sp. *Z. Angewandte Entomologie* 2: 29-56.

Bravo A, Gill SS, y Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.

Carozzi NB, Warren GW, Desai N, Jayne SM, Lotstein R, Rice DA, Evola S y Koziel MG. 1992. Expression of a chimeric CaMV 35S *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 20: 539-548.

Carrière Y, Crickmore N, y Tabashnik BE. 2015. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnology* 33: 161-168.

Carrière Y, Fabrick JA, Tabashnik BE, Horowitz AR y Ishaaya I. 2016. Advances in Managing Pest Resistance to Bt Crops: Pyramids and Seed Mixtures. In: *Advances in Insect Control and Resistance Management*. Springer.

Carson R. 2002. *Silent Spring*. A Crest Reprint Fawcett publications, Inc, Greenwich, Conn.

Castagnola A y Jurat-Fuentes JL. 2012. Bt crops: past and future. In: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Edited by E. Sansinenea. Springer.

Chakroun M, Banyuls N, Bel Y, Escriche B y Ferré J. 2016. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80: 329-350.

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J y Dean DH. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 807-813.

Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A y Dean DH. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ (Acc. 2019).

Donovan WP, Engleman JT, Donovan JC, Baum JA, Bunkers GJ, Chi DJ, Clinton WP, English L, Heck GR, Ilagan OM, Krasomil-Osterfeld KC, Pitkin JW, Roberts JK, Walters MR. 2006. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 713-719.

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA y Koziel MG. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *PNAS* 93: 5389-5394.

Frank JH. 2009. *Control of Pests and Weeds by Natural Enemies. An Introduction to Biological Control*. Wiley-Blackwell.

Glare T, Jurat-Fuentes JL y O'Callaghan M. 2017. Basic and Applied Research: Entomopathogenic Bacteria. In: *Microbial Control of Insect and Mite Pests. From Theory to Practice*. Academic Press.

Goldberg LJ y Margalit J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *American Mosquito Control Association* 37: 355-358.

González JMJ, Dulmage HT y Carlton BC. 1981. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 5: 351-365.

Hannay CL y Fitz-James P. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Canadian Journal of Microbiology* 1: 694-710.

Husz B. 1928. *Bacillus thuringiensis* Berl., a bacterium pathogenic to corn borer larvae. A preliminary report. *International Corn Borer Investigations. Scientific Reports* 1927-1928.

Ishiwata S. 1901. On a kind of flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Keiho* 114: 1-5.

Ishiwata S. 1905. About sottokin, a bacillus of a disease of the silk-worm. *Dainihon Sanshi Keiho* 161: 1-5.

Jurat-Fuentes J y Jackson T. 2012. Bacterial Entomopathogens. In: *Insect Pathology*. 2° ed. Kaya, H.; Vera, F (Eds.). Elsevier.

Krieg A, Schnetter W, Huger AM y Langenbruch GA. 1987. *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis, strain Bl 256-82: a third pathotype within the H-serotype 8a8b. *Systematic and Applied Microbiology* 9: 138-141.

Lambert B y Perferoen M. 1992. Insecticidal promise of insecticidal -endotoxin. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience* 42: 112-122.

Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N y Chen JS. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4648-4657.

Luttrell RG, Wan I y Knighten K. 1999. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* 92: 21-32.

Mazoyer M y Roudart L. 2006. *A History of World Agriculture: From the Neolithic Age to the Current Crisis*. NYU Press.



- Mehrotra S, Kumar S, Zahid M y Garg M.** 2017. Biopesticides. In: Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Singh R. (eds). Springer.
- Moar W, Roush R, Shelton A, Ferre J, MacIntosh S, Leonard BR y Abel C.** 2008. Field-evolved resistance to Bt toxins. *Nature Biotechnology* 26: 1072-1074.
- Morse RJ, Yamamoto T y Stroud RM.** 2001 Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9: 409-417.
- Ni M, Ma W, Wang X, Gao M, Dai Y, Wei X, Zhang L, Peng Y, Chen S, Ding L, Tian Y, Li J, Wang H, Wang X, Xu G, Guo W, Yang Y, Wu Y, Heuberger S, Tabashnik BE, Zhang T y Zhu Z.** 2017. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. *Plant Biotechnology Journal* 15: 1204-1213.
- Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J y Caballero P.** 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 6: 3296-3325.
- Peralta C y Palma L.** 2017. Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*? *Toxins* 9: 1-5.
- Ruiu L.** 2018. **Microbial Biopesticides in Agroecosystems.** *Agronomy* 8: 1-12.
- Ruiz de Escudero I, Estela A, Porcar M, Martínez C, Oguiza JA, Escriche B, Ferré J y Caballero P.** 2006. Molecular and insecticidal characterization of a Cry11 protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4796-4804.
- Sanchis V.** 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 31: 217-231.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR y Dean DH.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews* 62: 775-806.
- Schnepf HE y Whiteley HR.** 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *PNAS* 78: 2893-2897.
- Sena JA, Hernández-Rodríguez CS y Ferré J.** 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2236-2237.
- Soberón M, López-Díaz JA y Bravo A.** 2013. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides* 41: 87-93.
- Tabashnik BE, Van Rensburg JB y Càrriere Y.** 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology* 102: 2011-2025.
- Tabashnik BE, Brevault T y Càrriere Y.** 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology* 31: 510-521.
- Tabashnik BE, Unnithan GC, Masson L, Crowder DW, Li X y Càrriere Y.** 2009. Asymmetrical cross-resistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *PNAS* 106: 11889-11894.
- van Frankenhuyzen K.** 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.
- van Frankenhuyzen K.** 2013. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 76-85.
- Warren GW, Carozzi NB, Desai N y Koziel MG.** 1992. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *Journal of Economic Entomology* 85: 1651-1659.
- Weddle PW, Welterb SC y Thomson D.** 2009. History of IPM in California pears—50 years of pesticide use and the transition to biologically intensive IPM. *Pest Management Science* 65: 1287-1292.
- Welch KL, Unnithan GC, Degain BA, Wei J, Zhang J, Li X, Tabashnik BE y Càrriere Y.** 2015. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 149-156.
- Whalon ME, Mota-Sanchez D y Hollingworth RM.** 2008. *Global Pesticide Resistance in Arthropods.* Oxford University Press, Oxford, UK.

