

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MODO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS  
INSECTICIDAS DE *Bacillus thuringiensis*  
EN LAS PLAGAS FORESTALES  
*Thaumetopoea pityocampa* Y *Lymantria  
monacha***

Memoria presentada por Dña. Carolina Rausell Segarra  
para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas por  
la Universitat de València.

Valencia 1997.

UMI Number: U607197

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607197

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES

→ Químicas

Nº Registre 11501

DATA 12-1-98

SIGNATURA

442.T.D

Nº LIBRE ~~2~~ P. 18631514.

18 NOV. 1997  
Recepción de Entrada  
en F. Biológicas  
nº 136661

Dra. Amparo Martínez Ramírez, Doctora en Ciencias Biológicas y Dra. M<sup>a</sup> Dolores Real García, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

CERTIFICAN: que Dña. Carolina Rausell Segarra, Licenciada en Ciencias Químicas, con el fin de optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección la memoria de investigación que lleva por título: "Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en las plagas forestales *Thaumetopoea pityocampa* y *Lymantria monacha*".

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, expedimos el siguiente certificado en Burjassot a diecisiete de Noviembre de mil novecientos noventa y siete.

Amparo Martínez

M. Dolores Real

Fdo. Amparo Martínez Ramírez

Fdo. M<sup>a</sup> Dolores Real García



Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de este proyecto.

A Loles y Amparo, directoras de este trabajo, cuya realización hubiera sido muy difícil sin sus consejos y ayuda. Su continuo apoyo y dedicación, y la confianza depositada en mí, han constituido una motivación muy especial.

A los compañeros del Departamento de Genética, y sobre todo al grupo de Genética Bioquímica: Inma, Ana Carmen, Amparo, Pilar y Balta, por su espíritu de colaboración y su amistad, y por haber logrado crear un ambiente de trabajo realmente agradable. Especialmente quiero darle las gracias a Inma, por su ayuda en la carrera final contra reloj escaneando figuras y maquetando el manuscrito de la tesis.

A D. Eduardo Obama, el equipo del Laboratorio de Sanidad Vegetal de Mora de Rubielos (Teruel) y a los miembros del Servicio de Protección Vegetal de Silla (Valencia), cuya colaboración ha hecho posible llevar a cabo la parte aplicada de este trabajo. También quiero agradecer su ayuda al incondicional equipo de apoyo de las pruebas de campo: a Eugenio, que nos llevó al monte las veces que hizo falta, y a los “voluntarios” que colaboraron en los conteos y la recogida de huevos: Eugenio, Loles, Inma, Marcos, Irene y Ximo. Quiero agradecer a Loles especialmente su audacidad y tesón al abordar esta parte del proyecto.

Al Dr. Gruppe y la Dra. Pérez Guerra, de la Universidad de Munich (Alemania), gracias a los cuales fue posible iniciar el trabajo con *Lymantria monacha*, y también a Balta y la Dra. N. de Necker, de la Universidad de Limburg (Bélgica), por haber hecho posible una colaboración científica muy interesante.

Finalmente, quiero dar las gracias de manera muy entrañable a mi familia y mis amigos, que, desde fuera, me han animado y apoyado constantemente en mi trabajo.



## I INTRODUCCIÓN

---





---

I Introducción	1
1. El equilibrio en el monte y el fenómeno plaga	3
1.1 <i>Thaumetopoea pityocampa</i> Schiff. (procesionaria). Descripción del insecto y ciclo biológico	4
1.2 <i>Lymantria monacha</i> (L.) (mónaca o monja). Descripción del insecto y ciclo biológico	6
2. Métodos de lucha contra plagas forestales	8
3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
3.1 Utilización de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el control de plagas	10
3.2 Propiedades insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
3.3 Las $\delta$ -endotoxinas ó ICPs	13
3.3.1 Análisis genético de las $\delta$ -endotoxinas	13
3.3.2 Clasificación de las $\delta$ -endotoxinas	14
3.3.3 Estructura de las $\delta$ -endotoxinas	16
3.4 Modo de acción de las $\delta$ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
3.5 Ensayos de toxicidad con las ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
3.6 Resistencia a las ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
3.6.1 Mecanismos de resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
3.6.2 Genética de la resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
3.6.3 Manejo de la resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
II Objetivos	34
III Material y Métodos	37

1. Material biológico utilizado	39
2. Mantenimiento de las poblaciones de <i>Lymantria monacha</i> en el laboratorio	39
3. Obtención de las ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
4. Ensayos de toxicidad	40
5. Preparación de tejido y obtención de secciones histológicas	41
6. Tinción de azocamina de Heidenhains	41
7. Intoxicación de larvas de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> y <i>Lymantira monacha</i> con las ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i>	42
8. Detección <i>in vitro</i> de ICPs sobre secciones de tejido intestinal	42
9. Obtención de tejido intestinal y preparación de BBMVs	43
10. Biotinilación de ICPs	44
11. Ensayos de unión ICP biotinilada-receptor con detección ECL	44
12. Marcaje con Na <sup>125</sup> I de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac	45
13. Determinación de la actividad específica <sup>125</sup> I-ICP	45
14. Ensayos de unión ICP-receptor	46
15. Medidas electrofisiológicas en intestinos de <i>Lymantria monacha</i> : Técnica de perfusión luminal	46
15.1 Soluciones salinas e ICPs ensayadas	46
15.2 Disección	46
15.3 Montaje experimental	47
15.4 Medida de la diferencia de voltaje transepitelial	48

16. pruebas de campo	48
16.1 <i>Thaumetopoea pityocampa</i>	48
16.1.1 Prueba de campo a pequeña escala	48
16.1.2 Prueba de campo a gran escala	49
16.2 <i>Lymantria monacha</i>	52
IV Resultados	55
<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	57
1. Toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a la plaga forestal	
<i>Thaumetopoea pityocampa</i> (procesionaria del pino)	57
2. Mecanismo bioquímico de la toxicidad de las ICPs de <i>Bacillus</i>	
<i>Thuringiensis</i> frente a <i>Thaumetopoea pityocampa</i>	63
2.1 Detección inmunocitoquímica de la unión de diferentes	
ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i> a secciones del intestino	
del insecto	64
2.2 Experiencias de unión de toxinas biotinizadas a	
vesículas de membrana del intestino de <i>Thaumetopoea</i>	
<i>pityocampa</i>	66
2.3 Experiencias de unión de toxinas marcadas	
Radiactivamente a vesículas de membrana del intestino de	
<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	67
3. Evaluación de la eficacia en campo de distintas formulaciones	
Comerciales basadas en <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a	

<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	74
<i>Lymantria monacha</i>	79
1. Toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a la plaga forestal	
<i>Lymantria monacha</i>	86
2. Mecanismo bioquímico de la toxicidad de las ICPs de <i>Bacillus</i>	
<i>Thuringiensis</i> frente a <i>Lymantria monacha</i>	86
2.1 Detección inmunocitoquímica de la unión <i>in vitro</i>	
de diferentes ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i> a secciones	
de tejido intestinal de <i>Lymantria monacha</i>	86
2.2 Experiencias de unión de toxinas marcadas	
Radiactivamente a vesículas de membrana del intestino	
De <i>Lymantria monacha</i>	87
3. Evaluación de la eficacia en campo de distintas formulaciones	
Comerciales basadas en <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a	
<i>Lymantria monacha</i>	90
V Discusión	91
<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	93
1. Toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a la plaga	
forestal <i>Thaumetopoea pityocampa</i>	93
2. Mecanismo bioquímico de la toxicidad de las ICPs de	
<i>Bacillus thuringiensis</i> frente a <i>Thaumetopoea pityocampa</i>	95
3. Evaluación de la eficacia en campo de distintas formulaciones	

comerciales basadas en <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a	
<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	97
<i>Lyantria monacha</i>	101
1. Toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a la plaga	
forestal <i>Lymantria monacha</i>	101
2. Mecanismo bioquímico de la toxicidad de las ICPs de	
<i>Bacillus thuringiensis</i> frente a <i>Lymantria monacha</i>	105
3. Evaluación de la eficacia en campo de distintas formulaciones	
Comerciales basadas en <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a <i>Lymantria</i>	
<i>monacha</i>	110
VI Conclusiones	113
VII Bibliografía	117



### 1. El equilibrio biológico en el monte y el fenómeno plaga

El ecosistema forestal está constituido no sólo por los árboles y arbustos del monte, sino también por otros seres vivos, vegetales y animales, que juegan un papel a veces muy importante en la estabilidad del conjunto. Cuando el desarrollo de esta biocenosis es normal y la actividad de unos organismos no compromete la existencia de los otros, se puede decir que en el monte existe un equilibrio biológico y tanto los componentes como la estructura del ecosistema se conservan a lo largo del tiempo. Este equilibrio, sin embargo, puede verse alterado por factores climáticos adversos o por la acción nociva de algunos elementos vivos del ecosistema. Los desequilibrios más frecuentes que se registran en los montes a cargo de los seres vivos son los ocasionados por los hongos patógenos y por los insectos fitófagos. La aparición masiva de estos últimos ocasionan el fenómeno denominado plaga.

Las plagas de insectos han producido a lo largo de la historia verdaderas catástrofes forestales, y a pesar de todos los adelantos técnicos que existen para su combate, en la actualidad, los daños ocasionados por los insectos son, con relativa frecuencia, importantes.

La aparición de una plaga forestal puede tener varias causas. Los factores climáticos son los que más influyen sobre la reproducción masiva de los insectos, pero también pueden favorecerla la abundancia en el momento de cierto material adecuado para su reproducción, el debilitamiento de la masa arbórea, la desaparición o merma de los enemigos naturales del insecto dañino o incluso, los mismos trabajos selvícolas mal programados.

Las consecuencias del desequilibrio producido en el monte por una plaga van desde el debilitamiento y la pérdida total o parcial del crecimiento, hasta la muerte de la masa arbórea. El daño depende de la duración del ataque, de la época en que éste tiene lugar y, sobre todo, de la parte del árbol atacada.

Las plagas pueden dividirse en endémicas y epidémicas, según sus características. Las primeras son las que, por una serie de condiciones favorables del medio, sobre todo las climáticas, afectan casi de una manera constante e ininterrumpida a una zona e incluso a una región, produciendo generalmente daños más o menos intensos, con unos máximos irregularmente distribuidos. Este es el caso de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) en ciertas regiones españolas y en otros países mediterráneos, o de *Tortrix viridiana* en nuestros encinares.



Las plagas epidémicas, por el contrario, aparecen de vez en cuando con una virulencia extraordinaria y, mientras tanto, sus poblaciones, durante períodos más o menos largos, permanecen en los montes a unos niveles mínimos, los necesarios para poder conservar la especie. La desaparición de este tipo de plagas se debe, normalmente, a los cambios climáticos, a los enemigos naturales y a la inanición, después de que los insectos han devorado prácticamente todo lo que les servía de alimento. Estos son, por ejemplo, los casos de la lagarta peluda (*Lymantria dispar*) de nuestros encinares y alcornocales y de la mónaca (*Lymantria monacha*) de los pinares de pino silvestre.

En este trabajo, hemos centrado nuestro estudio en dos plagas forestales que afectan a los pinares españoles: *Thaumetopoea pityocampa* Schiff. (procesionaria) y *Lymantria monacha* (L.) (mónaca), representante cada una de ellas de los dos tipos de plagas antes mencionados.

### **1.1 *Thaumetopoea pityocampa* Schiff. (procesionaria). Descripción del insecto y ciclo biológico**

La procesionaria del pino es un lepidóptero de la familia *Thaumetopoeidae* propio de las zonas de clima mediterráneo. Se encuentra distribuida por España, Portugal, Francia, Italia, algunas localidades de Alemania, Suiza, Hungría y Bulgaria, en las costas del Adriático, en Grecia, Turquía, Siria, Líbano, Palestina, Israel, Egipto, Libia, Túnez, Argelia y Marruecos. Este insecto es actualmente el más importante defoliador de los pinares españoles, atacando preferentemente especies de pinos laricio, canario y silvestre, y en menor medida, pinos pinaster, carrasco y piñonero. La superficie total de los pinares amenazados gravemente por este insecto en nuestro país asciende aproximadamente a 1,200,000 hectáreas (Romanyk y Cadhia, 1981).

Durante el verano, al atardecer, las mariposas emergen del suelo y después de un corto vuelo, se fijan en las acículas o agujas de un pino de los alrededores, donde tras la cópula, extenderán los huevos. La puesta se hace sobre un par de acículas vecinas que la mariposa junta con las patas y ofrece un aspecto característico de canuto color pajizo que enfunda parcialmente las acículas. Las orugas nacen en 30 ó 40 días a partir de la puesta y mantendrán un carácter gregario durante toda su vida. Su alimentación es estrictamente crepuscular y nocturna, permaneciendo durante el día agrupadas en el interior del bolsón. A lo largo de su ciclo biológico las orugas sufren cuatro mudas y por lo tanto podemos encontrar larvas de cinco estadios diferentes:

#### Primer estadio (L1): 10 días.

Alimentación: acículas tiernas alrededor del lugar donde se realizó la puesta.

Tamaño: 5-6 mm de longitud.

Color: verde transparente.

Construcción de un nido provisional con hilos de seda, cerca del lugar de nacimiento.

Segundo estadio (L2): 12-18 días.

Alimentación: se mantienen las pautas.

Tamaño: 10-12 mm de longitud.

Color: Aparición de una pilosidad lateral blanca y dorsal amarilla.

Tercer estadio (L3): 30 días.

Emplazamiento definitivo de la colonia y formación de las típicas bolsas de orugas.

Coloración y aspecto característicos según el clima.

Aparición de los pelos urticantes (manchas negras en cada segmento).

Cuarto estadio (L4):

Zonas cálidas: 30 días; Zonas frías: todo el invierno (4 ó 5 meses).

Aumento significativo de tamaño.

Los efectos de defoliación son muy visibles.

Quinto estadio (L5): 30 días.

Alimentación muy activa.

Tamaño: 40 mm.

Al llegar a la madurez, las orugas se preparan para bajar y enterrarse en tierra, donde harán la crisálida. Pasan en la bolsa los últimos días, sin salir, poco antes de formar las largas procesiones de bajada, a principios de la primavera. Al enterrarse, tejen un capullo donde tendrá lugar la metamorfosis. Durante la metamorfosis, el período de diapausa puede alargarse o acortarse para ajustarse a las condiciones climáticas más favorables (puede llegar a 1 ó 2 años).

En la Figura 1 se muestra el ciclo biológico de este insecto.

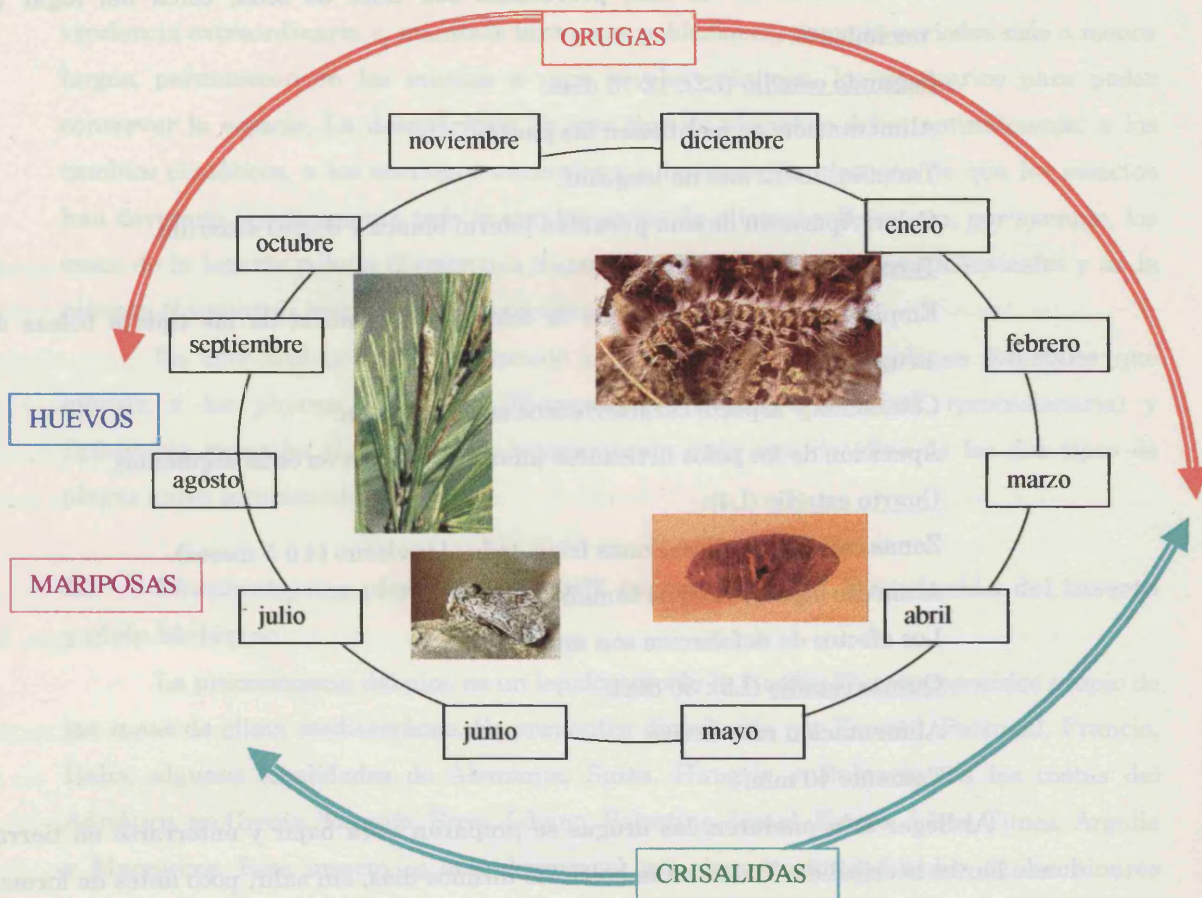


Figura 1.- Ciclo biológico de *Thaumetopoea pytiocampa*

## 1.2 *Lymantria monacha* (L.) (mónaca o monja). Descripción del insecto y ciclo biológico

*Lymantria monacha* es un lepidóptero de la familia *Lymantriidae* típicamente euroasiático, que no rebasa el paralelo 60. Se encuentra desde China a Escandinavia, pero prolifera sobre todo en Centroeuropa. España no parece encontrarse dentro del área óptima para este insecto, y sin embargo, han existido ataques de importancia en las masas de pino silvestre de las Cordilleras centrales. En cuanto a la extensión de estos ataques, en el año 1952 fueron observadas unas 60,000 hectáreas de pino silvestre parcial o totalmente defoliados en las provincias de Cuenca, Guadalajara, Teruel, Madrid, Segovia, Burgos y Soria. En la actualidad, una nueva aparición de esta plaga en los montes de Guadalajara y Teruel, en los años 1996-97 ha obligado a los responsables forestales de estas zonas a llevar a cabo tratamientos aéreos de las mismas para evitar una drástica defoliación.

Las orugas producen defoliaciones parciales o totales, según la intensidad de la plaga, en pleno período vegetativo de los árboles, atacando preferentemente especies de los géneros *Pinus*, *Abies* y *Picea*, y en este orden (Gruppe, 1993).

El ciclo de la mónaca es anual. Los imagos ponen los huevos a últimos de julio y primera quincena de agosto. Estos huevos invernan y en la primavera del año siguiente nacen las orugas. Las orugas recién nacidas permanecen agrupadas sobre la corteza del árbol durante unos días, lo que recibe el nombre de "fase de espejo". Posteriormente emigran a las ramas y comienzan a alimentarse defoliando el árbol. Al principio mantienen su gregarismo, que más tarde van perdiendo.

Sufren cuatro o cinco mudas a lo largo de su ciclo vital, siendo las hembras las que llegan hasta sexto estadio. En la naturaleza, el primer estadio (L1) dura una media de 18 días, del segundo al cuarto estadio (L2-L4), alrededor de 7 días cada uno, y el último estadio (L5, L6) unos 14 días.

La oruga recién nacida mide 4 ó 5 mm de longitud, y después de la cuarta muda, al alcanzar su tamaño definitivo, llega a los 45-50 mm. En la primera edad, la larva es negruzca, pero después adopta su coloración característica amarillenta verdosa con matices siena oscuro y unas características manchas azules y carmín en segmentos específicos del tórax y abdomen, en la parte dorsal.

En la Figura 2 se muestra el ciclo biológico de este insecto.

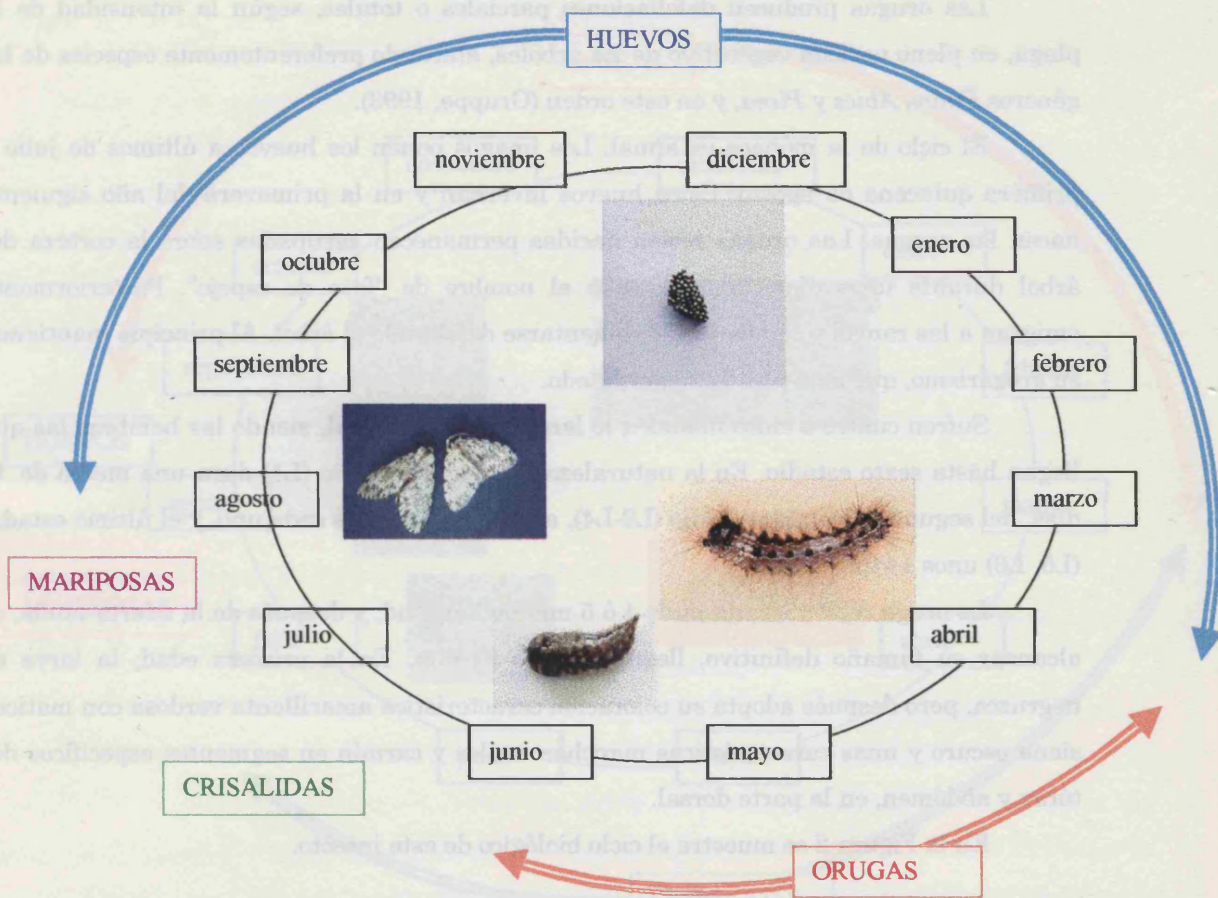


Figura 2.- Ciclo biológico de *Lymantria monacha*

## 2. Métodos de lucha contra plagas forestales

El combate contra las plagas forestales en los montes es difícil, notablemente más difícil que en los cultivos agrícolas, debido principalmente a las grandes extensiones de las masas forestales, a lo accidentado del terreno, la altura de los árboles, la espesura del bosque, etc., factores todos ellos que constituyen serios obstáculos para la realización de cualquier operación de control. Por otra parte, la rentabilidad del monte también condiciona las intervenciones que sobre él se pueden realizar.

La lucha contra plagas se refiere a cualquier método que pueda dar lugar a la reducción de los daños causados por los insectos. Esta acción ha de estar justificada por razones biológicas y económicas, y los métodos a emplear deben ser adecuados a las circunstancias biológicas, económicas y técnicas existentes.

Cuando los factores naturales que controlan una plaga de insectos se vuelven inoperantes, los responsables de los montes o de la protección de los cultivos deben hacer uso de los métodos de control aplicado. Los métodos que han venido utilizándose hasta la fecha pueden clasificarse de la siguiente manera:

Métodos culturales:

- Podar, limpiar y aclarar, etc.
- Elección de variedades o portainjertos resistentes.
- Métodos selvícolas y culturales: época, rotación y sistemas de cultivo.

Métodos técnicos:

- a) Insecticidas químicos
  - Compuestos inorgánicos de arsénico y flúor.
  - Insecticidas obtenidos de plantas: nicotina, rotenona y pelitre.
  - Aceites insecticidas: derivados del petróleo o de la hulla.
  - Insecticidas de síntesis: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides.
- b) Métodos de destrucción física
  - Mecánicos.
  - Calóricos.

Métodos biotécnicos:

- a) Estímulos químicos
  - Hormonas.
  - Feromonas.
  - Inhibidores del crecimiento.
  - Atrayentes.
  - Repelentes.
  - Estimuladores del apetito.
  - Disuasores del apetito.
- b) Estímulos físicos
  - Sonido.
  - Luz.
  - Color.

Métodos biológicos:

- Parásitos y depredadores: introducción, colonización y promoción.
- Insecticidas de origen biológico: *Bacillus thuringiensis*, virus y hongos.

La utilización unilateral de un determinado procedimiento de lucha puede tener efectos inesperados e indeseables, como se ha podido comprobar ampliamente tras el uso intensivo de los insecticidas químicos con los problemas de inducción de resistencias en los insectos, eliminación de fauna beneficiosa, aparición de brotes de plagas secundarias, contaminación del medio ambiente y presencia de residuos tóxicos en los vegetales tratados. Por ello, se ha ido abriendo paso el concepto de lucha integrada. Este sistema de lucha ha sido definido por la Organización Internacional de Lucha Biológica (O.I.L.B.) como “la lucha contra los organismos perjudiciales, utilizando un conjunto de métodos que satisfagan simultáneamente las exigencias económicas, ecológicas y toxicológicas, reservando la prioridad de actuación a los elementos naturales de control y respetando los límites de tolerancia” (entendiendo por “límite de tolerancia” el nivel de daño económico por debajo del cual no está justificado el tratamiento químico).

Actualmente, el tipo de intervención y los medios utilizados para el control de las dos plagas forestales objeto de estudio en este trabajo (*Thaumetopoea pityocampa* y *Lymantria monacha*) son los siguientes:

- Tratamientos masivos fundamentalmente con inhibidores del crecimiento (diflubenzurón), y en menor medida, con piretroides e insecticidas microbiológicos basados en *Bacillus thuringiensis* o virus de la polihedrosis nuclear (estos últimos en el caso de la mónaca).
- Métodos físicos, principalmente en el caso de procesionaria, con la corta y quema de bolsones y destrucción de bolsones a tiro de escopeta.
- Empleo de feromonas, concebido para niveles bajos de infestación y puesto a punto para procesionaria, desde que en 1981 se lograra la síntesis de la feromona sexual de la hembra de este insecto.
- Adecuación de la estructura forestal, mediante repoblación con especies de pino menos vulnerables al ataque de procesionaria, sobre todo.

### 3. *Bacillus thuringiensis*

#### 3.1 Utilización de *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas

El énfasis especial con que el concepto de lucha integrada trata el aspecto de la protección del medio ambiente está reflejando una sensibilización social importante a este nivel, y ha favorecido el desarrollo de alternativas ecológicas al uso de insecticidas químicos. Dentro de este grupo se encuentran los bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis*, que pueden ser utilizados tanto como agentes de control biológico de plagas agrícolas y forestales, como en la eliminación de vectores de enfermedades humanas, pero son inocuos para el hombre y prácticamente toda la flora y fauna beneficiosa, además de ser biodegradables y causar un impacto ambiental mínimo.

En esta última década, las aplicaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* como bioplaguicida han aumentado hasta constituir alrededor del 90% del mercado mundial de insecticidas biológicos. De ellos, el 60% corresponde al tratamiento de plagas agrícolas y el 40% restante se repartió a partes iguales en el control de plagas forestales y de vectores de enfermedades. América del Norte y el Lejano Oriente son los mercados más desarrollados, mientras que el mercado europeo es considerablemente más pequeño (van Frankenhuyzen, 1993).

La utilización de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas forestales se inició a principios de los años 60, pero no fue hasta mediados de los 80 cuando se puede hablar de un uso masivo. Fue en esta época cuando las mejoras en las formulaciones y la tecnología de aplicación permitieron reducir los costos y aumentar la eficacia de los tratamientos, con lo que este microorganismo se empezó a perfilar como una alternativa ecológica válida en el bosque (van Frankenhuyzen, 1990).

Existen dos factores importantes que han favorecido el uso de *Bacillus thuringiensis* en el ámbito forestal, en comparación con su utilización agrícola. Por una parte, en un ecosistema forestal, donde los umbrales de daño económico no están bien definidos, una defoliación limitada es aceptable. Sin embargo, el daño en frutas y vegetales destinados al consumo humano no es tolerable porque disminuye drásticamente la rentabilidad económica de los cultivos. Así, un agente de control como *Bacillus thuringiensis*, caracterizado por una eficacia poco predecible, va a ser inicialmente más aceptado para el tratamiento de bosques que de cultivos agrícolas, donde la eficacia insecticida es un punto crítico. Por otra parte, la presión pública para erradicar el uso de insecticidas químicos en áreas residenciales de bosque ha promovido considerablemente el uso de otras alternativas de control de plagas en este ámbito, mientras que en el caso de los cultivos agrícolas, esta presión ha sido mucho menos efectiva.

Actualmente *Bacillus thuringiensis* tiene un uso muy extendido para el control de subespecies de *Choristoneura* y *Lymantria dispar* fundamentalmente, en los bosques de América del Norte y Canadá (donde este bioinsecticida ha reemplazado aproximadamente a la mitad de los insecticidas químicos utilizados anteriormente). En Europa, *Bacillus thuringiensis* se ha utilizado también en el ámbito forestal (aunque mucho menos extensamente) para el control de *Dendrolimus sibiricus* en la antigua Unión Soviética y subespecies de *Lymantria* en Bulgaria y Polonia, principalmente. En países del área mediterránea también se está imponiendo la utilización de este bioinsecticida para el control de *Thaumetopoea pityocampa* (procesionaria del pino) (Navon, 1993).

Sin embargo, a pesar del innegable éxito ecológico y comercial de *Bacillus thuringiensis* en los ámbitos agrícola y forestal, para que este patógeno microbiano deje de ser considerado un insecticida auxiliar y se convierta en un método de control de plagas



sólido y competitivo, tienen que ser superadas una serie de limitaciones inherentes a su constitución:

- Su relativo estrecho espectro de especies de insectos susceptibles, frente a los insecticidas químicos de amplio espectro, que limita claramente su mercado potencial.
- Su efectividad variable, puesto que ha de ser ingerido por el insecto y en este sentido la eficacia de la dosis depende de su aplicación en el momento adecuado y condiciones ambientales propicias.
- El coste de las aplicaciones en campo, que aún continúa siendo significativamente mayor que los tratamientos con insecticidas químicos.

La clave para mejorar la eficacia de *Bacillus thuringiensis* y reducir los costos de los tratamientos reside en varios aspectos fundamentales, en los que se continúa trabajando actualmente:

- El avance en el conocimiento del modo de acción, fisiología, ecología y biología molecular de este microorganismo, para poder aprovechar al máximo sus posibilidades como bioinsecticida.
- La selección y comercialización de nuevas cepas con diferentes espectros insecticidas, junto con la modificación genética de las cepas ya existentes, para incrementar su toxicidad y su espectro insecticida.
- La explotación biotecnológica de esta bacteria para la clonación y expresión de los genes que codifican las  $\delta$ -endotoxinas en una amplia variedad de microorganismos (desde baculovirus a cianobacterias) y plantas de interés agronómico (maíz, arroz, tabaco, patata, tomate, etc.). Estos organismos transgénicos pueden utilizarse como vectores de transferencia de toxinas alternativos a los métodos convencionales (aplicaciones manuales o aéreas), ampliando el espectro insecticida de *Bacillus thuringiensis* e incrementando su limitada actividad residual.
- El desarrollo de formulaciones comerciales con mayor potencia y persistencia en campo, para evitar los problemas de dosificación adecuada y rápida degradación de la materia activa por acción de la luz UV y el efecto de lavado de la lluvia.
- La mejora en la tecnología de los sistemas de aplicación convencionales para conseguir una mejor cobertura foliar, una dosificación y tamaño de gota más adecuados y una menor pérdida de producto durante las aplicaciones.

### 3.2 Propiedades insecticidas de *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram + formadora de esporas perteneciente a la familia *Bacillaceae*, que sintetiza distintos tipos de metabolitos con acción insecticida:

#### $\alpha$ - y $\beta$ -exotoxinas

Ambas tienen actividad insecticida pero no son específicas de insectos. La  $\alpha$ -exotoxina es una proteína termosensible producida durante la fase de crecimiento vegetativo de la bacteria, que presenta toxicidad frente a ratones y lepidópteros (Krieg, 1971). Las  $\beta$ -exotoxinas, por su parte, son derivados de adenosina termoestables y actúan inhibiendo la transcripción de proteínas al interferir con la RNA polimerasa dependiente de DNA, ya que se trata de análogos del ATP y compiten por su sitio de unión en el enzima (Sebesta *et al.*, 1981).

#### Proteínas insecticidas vegetativas (VIPs)

Estas proteínas, de muy reciente descubrimiento, se sintetizan durante la fase de crecimiento logarítmico vegetativo, antes de la esporulación (Estruch *et al.*, 1996). Presentan actividad insecticida frente a plagas de lepidópteros que son menos sensibles a las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, con las que no tienen ninguna homología estructural que sugiera un modo de acción similar.

#### $\delta$ -endotoxinas ó ICPs (Insecticidal Crystal Proteins)

Estas toxinas, también conocidas como ICPs o proteínas Cry, se sintetizan durante la esporulación de la bacteria, en forma de inclusiones cristalinas paraesporales, que representan del 20 al 30% del peso seco de un cultivo esporulado. Su toxicidad, altamente específica frente a diversas especies de insectos plaga, junto con el hecho de que estén codificadas por genes únicos (que resultan candidatos idóneos para la modificación genética), han convertido a las ICPs de *Bacillus thuringiensis* en la clave para la utilización de este organismo como insecticida biológico. Además, el hecho de que diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* sean capaces de sintetizar más de un cristal, que a su vez puede estar compuesto de diferentes toxinas, ha incrementado el potencial comercial de esta bacteria como bioplaguicida.

### 3.3 Las $\delta$ -endotoxinas ó ICPs

#### 3.3.1 Análisis genético de las $\delta$ -endotoxinas

La mayoría de los genes que codifican las ICPs ó genes cry, están localizados en plásmidos de tamaño variable (González *et al.*, 1981), aunque algunos de ellos también han sido observados en el cromosoma de *Bacillus thuringiensis* (Klier *et al.*, 1982; Kronstad *et al.*, 1983; Carlson y Kolstö, 1993). Estos genes se expresan normalmente durante la fase estacionaria de la célula bajo el control transcripcional de factores  $\sigma$  dependientes de la esporulación.

Actualmente se han caracterizado 96 genes que codifican  $\delta$ -endotoxinas, aunque algunos de ellos presentan secuencias muy similares y podrían por tanto representar variantes de un mismo gen.

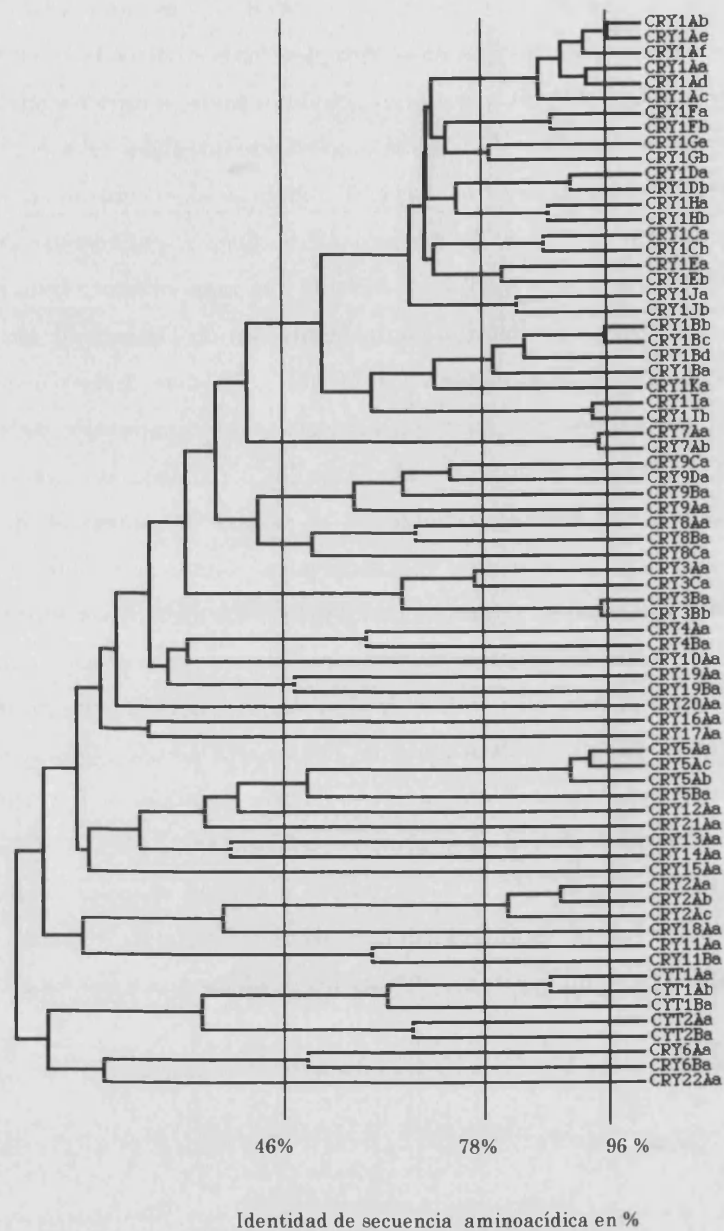
Los genes cry presentan una estructura tipo transposón al estar flanqueados por dos conjuntos de repeticiones invertidas y algunos de ellos contienen también un elemento transponible (Lereclus *et al.*, 1989). Además, se ha observado que algunos de los plásmidos que contienen estos genes pueden ser transferidos a otras cepas, mediante un proceso semejante a la conjugación (González *et al.*, 1982; Reddy *et al.*, 1987), creándose así nuevas combinaciones. Todo ello puede explicar la multiplicidad de genes cry encontrados en plásmidos diferentes y el diverso espectro de actividad de *Bacillus thuringiensis*.

La gran diversidad existente entre las cepas de *Bacillus thuringiensis* puede explicarse también por otros fenómenos, tales como la pérdida espontánea de los plásmidos (Carlton y Gawron-Burke, 1993) o la posible coevolución de los genes bacterianos que codifican las toxinas y los genes de las proteínas diana en los distintos huéspedes, de manera que cuando un insecto desarrolla resistencia frente a una cepa, se produciría una presión de selección favorable para el desarrollo de otra cepa microbiana diferente (Feitelson *et al.*, 1992).

### 3.3.2 Clasificación de las $\delta$ -endotoxinas

El hecho de que el espectro de toxicidad de las distintas variedades de *Bacillus thuringiensis* dependa de las ICPs (Lereclus *et al.*, 1993), llevó a Höfte y Whiteley (1989) a proponer una nomenclatura uniforme y un esquema de la clasificación basada en los genes cry que codifican para estas proteínas y en la especificidad de su actividad insecticida. Hasta ese momento se habían clonado y caracterizado 42 genes cry, muchos de los cuales tenían secuencias muy similares. Considerando que las clases con secuencias casi idénticas correspondían a variantes de un mismo gen, se realizó una clasificación de 14 genes. De ellos, 13 codificaban para proteínas Cry y el último para la proteína citolítica CytA. Los 13 genes cry se dividieron en 4 clases: cryI, específicos contra lepidópteros; cryII, específicos contra lepidópteros y dípteros; cryIII específicos contra coleópteros y cryIV, específicos contra dípteros, mientras que el gen cytA, encontrado en cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*, codifica para una proteína de 27 kDa que presenta actividad citolítica contra células de vertebrados e invertebrados. Posteriormente, se ha continuado describiendo nuevos genes de *Bacillus thuringiensis* que codifican para otras proteínas Cry, algunos de los cuales son específicos frente a nemátodos, protozoos, tremátodos, ácaros e himenópteros (Feitelson, 1993), además de otros genes cyt, que codifican proteínas con actividad citolítica.

Aunque la clasificación de Höfte y Whiteley es muy útil, cada vez han ido apareciendo más casos en los que no se cumplen los supuestos bajo los que está realizada. Por ejemplo, CryIA(b) y CryIC presentan actividad frente a dípteros (Smith, 1995), y CryIB frente a coleópteros (Bradley *et al.*, 1995), a pesar de que todos ellos están clasificados como específicos para lepidópteros (grupo CryI). También se ha encontrado que CryIIA, CryIIIA y CryIVD son activas frente al homóptero *Macrosiphum euphorbiae* (Walters y English, 1995). Así, Crickmore *et al.* (1995) han sugerido una nomenclatura revisada de los genes cry de *Bacillus thuringiensis* basada únicamente en la identidad de la secuencia de aminoácidos de las correspondientes proteínas. En este nuevo sistema, los números romanos son sustituidos por números arábigos y eliminados los paréntesis. Usando el programa de ordenador ClustalW se calcularon los porcentajes de semejanza entre pares de toxinas y mediante el programa Neighbor, se realizó la conversión de esos datos en un dendograma. De los 22 grupos de secuencias similares establecidas, 20 de ellas corresponden a proteínas Cry (de Cry1 a Cry16) y los otros dos restantes a proteínas Cyt (CytA y CytB). En la Figura 3, las tres líneas verticales trazadas representan aproximadamente el 46%, 78% y 96% de similitud de secuencia de aminoácidos, y definen cuatro categorías. De izquierda a derecha, la primera división (similitudes hasta el 46%) marca las diferencias entre los 22 grupos de proteínas Cry y Cyt (número arábigo); la segunda división (diferencias de similitud del 46% al 78%) es la que define la primera letra (mayúscula) al nombrar las ICPs, mientras que la tercera división (diferencias de similitud del 78% al 96%) define la segunda letra (minúscula). La cuarta división está compuesta por toxinas que difieren en menos de un 96%, es decir, alelos de un mismo gen.



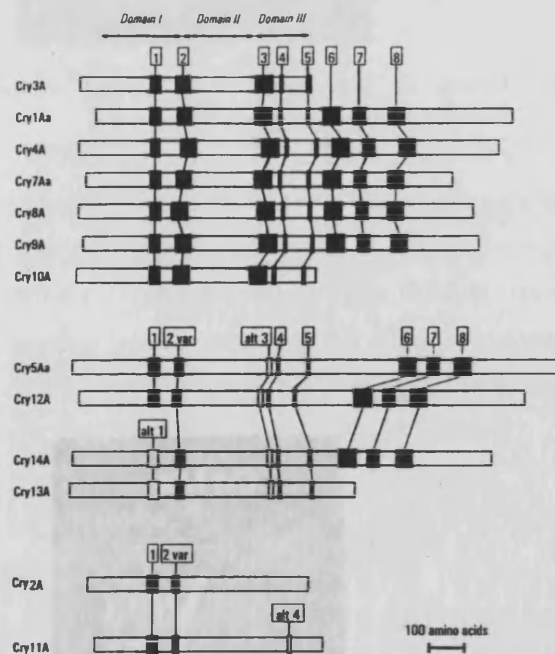
**Figura 3.- Relaciones entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cry determinadas mediante el análisis de alineamiento múltiple ClustalW (Crickmore *et al.*, 1997). Las líneas verticales demarcan los cuatro niveles de similitud de secuencia de los que se habla en el texto.**

### 3.3.3 Estructura de las $\delta$ -endotoxinas

Los genes cry codifican protoxinas de pesos moleculares comprendidos entre 50 y 140 kDa que son activados por la acción de proteasas del intestino medio de los insectos que los ingieren, al ser eliminados péptidos de los extremos N- y/o C-terminal. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos resultantes permite analizar su similitud o divergencia. Así, Höfte y Whiteley (1989) identificaron cinco bloques en la zona resistente a proteasas

con secuencias altamente variables y de diferentes tamaños dependiendo del tipo de proteína. Atendiendo a la presencia o ausencia de estos bloques, Schnepf *et al.* (1997) distinguen tres tipos diferentes de proteínas Cry (Fig 4). El primer grupo está formado por las ICPs que presentan los cinco bloques conservados (Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 y Cry10). El segundo grupo está formado por toxinas que presentan conservados los bloques 1, 2, 4 y 5 (Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14). Aquí existe un nuevo bloque conservado (alt3) que no se encuentra en el primer grupo, pero ambos grupos presentan tres bloques conservados en la zona que se proteoliza (bloques 6, 7 y 8). El tercer grupo lo constituyen las ICPs Cry2 y Cry11, con únicamente el bloque 1 conservado, además de una variante del bloque 2 (var2) y la aparición de un nuevo bloque conservado (alt4). Cry6 y Cry15 no mostraron ninguna homología con los bloques conservados.

El hecho de que todas las proteínas Cry, a excepción de Cry2 y Cry11 posean un tramo de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal sugiere que esta región sea la implicada en la interacción de la ICP con el intestino medio de los insectos (Höfte y Whitley, 1989). Además, se puede observar que las ICPs presentan un alto grado de conservación de residuos internos, lo que induce a pensar que las proteínas homólogas adoptarán un plegamiento similar.



**Figura 4.- Representación esquemática de los bloques conservados en las diferentes proteínas Cry (citado en Denolf, 1997).** Los rectángulos sombreados indican la posición y el tamaño relativo de los bloques conservados en cada caso. Los rectángulos no sombreados corresponden a posibles secuencias alternativas de poca o ninguna homología.

Actualmente se ha determinado la estructura terciaria, mediante cristalografía de rayos-X, de dos proteínas Cry: Cry3A, específica para coleópteros (Li *et al.*, 1991) y Cry1Aa, tóxica para lepidópteros (Borisava *et al.*, 1994).

Cry3A presenta tres dominios estructurales distintos (Figura 5). El dominio I consta de 290 aminoácidos del extremo N-terminal y es un clúster de siete hélices  $\alpha$ , seis de las cuales se disponen alrededor de una central que además es hidrófoba. Las hélices 1 y 7, que se sitúan cerca del dominio II son ricas en residuos hidrófobos, mientras que las hélices  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  y  $\alpha_6$ , que están encaradas hacia el exterior, son relativamente hidrófilas. El dominio II está constituido por tres hojas  $\beta$ , estructuralmente homólogas y dispuestas formando una columna. El dominio III contiene varias cadenas  $\beta$  antiparalelas (Li *et al.*, 1991).

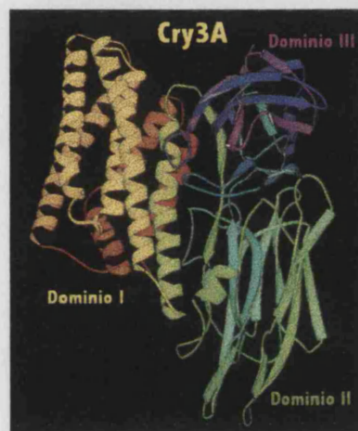


Figura 5.- Estructura cristalográfica propuesta para la proteína Cry3A (Li *et al.*, 1991)

El estudio cristalográfico de Cry1Aa (Figura 6) ha mostrado que esta molécula contiene también tres dominios: un haz formado por ocho hélices, desde el aminoácido 34 al 250, otro dominio de tres hojas  $\beta$  (aminoácidos 258 a 457) y un tercer dominio en  $\beta$ -sandwich (aminoácidos 463 a 600) (Grochulski *et al.*, 1995). El plegamiento de estos tres dominios es similar a los de la proteína Cry3A.

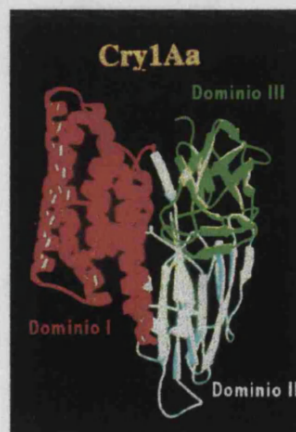


Figura 6.- Estructura cristalográfica propuesta para la proteína Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995)

Poder disponer de las estructuras tridimensionales de las toxinas Cry1Aa y Cry3A, así como de los resultados de los ensayos de toxicidad con ICPs híbridas y mutantes, ha permitido establecer relaciones de estructura-función entre las secuencias de aminoácidos de las ICPs y su interacción con la membrana epitelial del intestino medio de los insectos susceptibles. Así, se piensa que el dominio I estaría implicado en la formación de poros en la membrana, mientras que los dominios II y III estarían relacionados con la unión al receptor y la especificidad de las ICPs.

### **3.4 Modo de acción de las $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis***

Como las ICPs de *Bacillus thuringiensis* no pueden penetrar a través de la cutícula de las larvas, deben ser ingeridas para poder llevar a cabo su acción tóxica. Así, cuando una larva de un insecto susceptible ingiere una toxina, se desencadenan en su intestino una serie de procesos que conducen a cambios fisiológicos que finalizan con su muerte. Por lo general, el intestino se paraliza, cesa la ingestión de alimentos y la larva muere al cabo de unos días (Heimpel y Angus, 1959). Los efectos patológicos de la intoxicación se manifiestan principalmente en el intestino medio del insecto, que consta de un epitelio formado por una monocapa de células situado sobre una membrana basal. El epitelio intestinal está formado principalmente por tres tipos de células: las células columnares, que tienen una función digestiva y de absorción, las células calciformes, que están implicadas en el transporte de iones, y las células regenerativas (Figura 7). Durante su diferenciación, las células columnares forman numerosas microvellosidades en su parte apical, lo que se denomina borde estriado o en cepillo. Las células calciformes se caracterizan por tener una gran cavidad oval que está en contacto con el lumen, y presentan el núcleo en posición basal. Las células regenerativas son pequeñas y triangulares, y se distribuyen, individualmente o en grupo, entre las células columnares y las calciformes. En el lumen del tracto intestinal de la mayoría de los insectos, y bordeando el epitelio, se encuentra la membrana peritrófica, cuya función es proteger el epitelio de los daños producidos por posibles ataques bacterianos o por las partículas de comida (Dow, 1986), y permite el paso de macromoléculas de peso molecular inferior a 60 kDa (Adang y Spence, 1982).



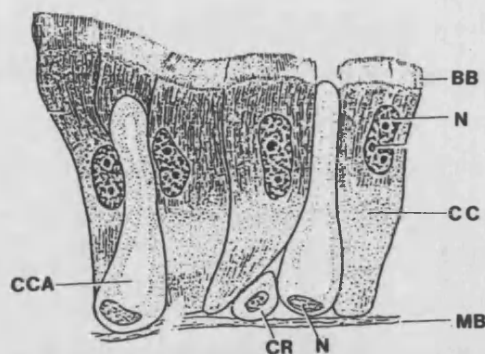


Figura 7.- Esquema del epitelio intestinal del intestino medio de una larva de insecto. MB: membrana basal, CC: célula columnar, CCA: célula calciforme, CR: célula regenerativa, BB: borde estriado, N: núcleo.

El primer efecto producido por la ingestión de las  $\delta$ -endotoxinas es el aumento de volumen de las células columnares, de tal manera que las microvellosidades se acortan y quedan prácticamente integradas dentro de las células. A continuación, el citoplasma se vacuoliza y el retículo endoplásmico y las mitocondrias se desintegran gradualmente. El epitelio pierde su funcionalidad, lo que conduce a un intercambio de fluidos libre entre la hemolinfa y el lumen intestinal, rompiéndose el equilibrio osmótico. El resultado final es la lisis celular y la destrucción del intestino (Endo y Hishiitsutsuje-Uwo, 1980; Lühty y Ebersold, 1981; Mathavan *et al.*, 1989; Bauer y Pankratz, 1992).

Los procesos bioquímicos necesarios para que las ICPs de *Bacillus thuringiensis* lleven a cabo su acción tóxica son los siguientes:

1.- Solubilización del cristal y procesado proteolítico

Las  $\delta$ -endotoxinas se sintetizan en forma de protoxina dentro de las inclusiones cristalinas paraesporales. Para ejercer su acción insecticida, las protoxinas deben ser primeramente solubilizadas en el intestino y posteriormente activadas, ya sea por proteasas del intestino del insecto o por proteasas asociadas a los propios cristales (Thurley *et al.*, 1985; Dow, 1986; Canon *et al.*, 1989).

El alto pH del intestino de la mayoría de los insectos diana (Dow, 1984) es esencial para la disolución de la mayoría de los cristales, que normalmente se disuelven a pH superiores a 9.5, liberándose las  $\delta$ -endotoxinas. Se ha comprobado que tanto la composición del lumen del intestino como la composición del cristal de *Bacillus thuringiensis* influyen en la eficacia de la solubilización (Jaquet *et al.*, 1987; Aronson *et al.*, 1991), y en la especificidad de las ICPs.

Por su parte, la activación de las toxinas es realizada por serin-proteasas, que eliminan normalmente 500 aminoácidos del extremo C-terminal de las protoxinas de 130

kDa y 28 aminoácidos del extremo N-terminal, conservando un fragmento activo de 60-78 kDa resistente a proteasas y que comprende la mitad N-terminal de la protoxina (Lecadet y Dedonder, 1967; Tojo y Aizawa, 1983). Las proteínas de 70 kDa como las Cry2, Cry3 y Cry4D se pueden considerar formas truncadas naturalmente de la mitad N-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa y no sufren proteólisis en su extremo C-terminal (Hodgman y Ellar, 1990). Sin embargo, en el extremo N-terminal de Cry2 y Cry3A sí que se eliminan algunos aminoácidos (Adang, 1991; Carrol *et al.*, 1989).

Del mismo modo que la solubilización, la proteólisis también puede determinar la especificidad de las  $\delta$ -endotoxinas. Por ejemplo, una ICP de *Bacillus thuringiensis aizawai*, tóxica para larvas tanto de lepidópteros como de dípteros, retiene su actividad contra especies de los dos grupos tras ser activada por proteasas del intestino de lepidópteros. Sin embargo, cuando se trata con contenido intestinal procedente de dípteros, la toxicidad sólo se mantiene contra especies de este grupo (Haider *et al.*, 1986).

## 2.- Interacción del fragmento tóxico con las células del intestino

Tras la ingestión del cristal, su solubilización en el lumen del intestino medio y la activación de las protoxinas individuales, el tejido diana de las ICPs es el epitelio del intestino medio del insecto, al que se unen específicamente.

Esto se ha demostrado mediante experiencias de incubación de secciones histológicas del intestino larvario con las toxinas de *Bacillus thuringiensis* o el análisis de la unión *in vivo* de toxinas al epitelio intestinal tras ensayos de ingestión forzada de estas proteínas en larvas susceptibles (Bravo *et al.*, 1992a; Bravo *et al.*, 1992b; Denolf *et al.*, 1993a; Denolf *et al.*, 1993 b; Escriche *et al.*, 1994; Estada y Ferré, 1994; Ravoahangimalala y Charles, 1995). Los experimentos de unión *in vitro* utilizando vesículas de la membrana intestinal del insecto (constituidas mayoritariamente por la membrana apical del borde en cepillo de las células columnares del intestino), y  $\delta$ -endotoxinas marcadas con  $^{125}\text{I}$  también muestran una correlación entre la toxicidad de las ICPs y la existencia de sitios de unión de alta afinidad para los mismos en las vesículas de membrana (Wolfesberger *et al.*, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a; Hofmann *et al.*, 1988b; Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990a; Li *et al.*, 1992; Denolf *et al.*, 1993a; Ihara *et al.*, 1993; Escriche *et al.*, 1994; Estada y Ferré, 1994; Liang *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997). Los resultados sugieren que los receptores de las  $\delta$ -endotoxinas en el epitelio intestinal de las larvas susceptibles determinan su especificidad, y que su toxicidad podría resultar tanto del número de receptores presentes como de la afinidad de las ICPs por los mismos.

Sin embargo, algunos experimentos han demostrado que esta correlación no se cumple en todos los casos. Por ejemplo, en la plaga forestal *Lymantria dispar*, la ICP Cry1Ab resulta más tóxica que Cry1Ac y sin embargo, los parámetros bioquímicos de la unión toxina-receptor obtenidos en las experiencias de competencia homóloga demuestran

que Cry1Ac tiene mayor afinidad por los sitios de unión a la membrana intestinal que Cry1Ab (Wolfesberger, 1990). En el caso de *Spodoptera frugiperda*, tampoco se pudo correlacionar la toxicidad de Cry1Ac con los sitios de unión al epitelio del intestino (Garczynsky *et al.*, 1991). Por otro lado, el modelo de unión de Cry1E a vesículas de membrana de *Manduca sexta* y *Spodoptera littoralis* no refleja su toxicidad *in vivo* frente a estos dos insectos (Van Rie *et al.*, 1990a). De todo esto se deduce que la unión de la ICP al receptor del epitelio intestinal es importante, pero sólo para una parte del proceso insecticida.

En los últimos años, se ha realizado un esfuerzo muy importante para conseguir la identificación de los receptores para las toxinas de *Bacillus thuringiensis* en los insectos diana, moléculas de la membrana intestinal de las que se desconoce tanto su función real como el modo en que están implicadas en la acción de las ICPs.

La aproximación experimental que más se ha utilizado para lograr esta identificación es mediante la técnica del "ligand-blot", con la que las proteínas de vesículas de membrana son separadas mediante electroforesis y posterior transferencia a filtros de nitrocelulosa, y las posibles proteínas receptoras se identifican mediante anticuerpos contra las toxinas o utilizando ICPs marcadas radiactivamente. Además, para poder demostrar de manera inequívoca que estas moléculas son los receptores de *Bacillus thuringiensis*, debe confirmarse que, en presencia de toxina, son capaces de provocar la formación de poros después de ser reconstituídas en bicapas lipídicas donde no estén presentes otras proteínas.

Los primeros estudios se realizaron con cultivos de líneas celulares de insectos. Utilizando la línea celular CF-1 del lepidóptero *Choristoneura fumiferana* se demostró que las ICPs de la cepa *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, Cry1Aa y Cry1Ab, se unían a una glicoproteína de 146 kDa (Knowles y Ellar, 1986). Posteriormente, estos estudios se extendieron a vesículas de membrana obtenidas directamente de intestinos de insectos. Así, en *Heliothis virescens* se ha demostrado que Cry1Aa y Cry1Ab se unen a la misma proteína de 170 kDa, mientras que Cry1Ac se une a dos proteínas de 140 y 120 kDa (Oddou *et al.*, 1991). En *Spodoptera littoralis*, Cry1C se une a dos proteínas de 40 y 65 kDa, y Cry1Ac a una de 40 kDa y débilmente a otra proteína de 120 kDa (Garczynsky *et al.*, 1991; Sanchis y Ellar, 1993). Cuando se incuban vesículas del borde en cepillo de la membrana intestinal de *Spodoptera littura* y *Bombyx mori* con proteínas de la cepa *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, se identifican proteínas de 220, 150 y 130 kDa en *Bombyx mori* y de 160 kDa en *Spodoptera littura* (Indrasith y Hori, 1992). En *Manduca sexta*, Cry1Ac se une a una proteína de 120 kDa (Knowles *et al.*, 1991; Garczynsky *et al.*, 1991; Sangadala *et al.*, 1994, Knigh *et al.*, 1994), Cry1Ab a otra proteína de 210 kDa (Vadlamudi *et al.*, 1993) y Cry1C a una de 106 kDa (Luo *et al.*, 1996). También se ha identificado en vesículas de membrana de este insecto una proteína de 210 kDa capaz de

unir Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (Martínez-Ramírez *et al.*, 1994; Martínez-Ramírez, 1995; Francis y Bulla, 1997). En *Lymantria dispar* una proteína de 120 kDa también es capaz de unir Cry1Ac (Valaitis *et al.*, 1995). En el único coleóptero en el que hasta el momento se ha identificado una proteína de unión para una ICP es en *Tenebrio molitor*, en el que se ha detectado unión de Cry3A a una proteína de 144 kDa (Belfiore *et al.*, 1994). En dípteros, recientemente se ha encontrado una proteína de 148 kDa y otra de 78 kDa a las que se une Cry4D en *Anopheles stephensi* y *Tipula oleacea*, respectivamente (Feldmann *et al.*, 1995). En la Tabla I se citan algunas de las proteínas de membrana descritas hasta el momento con capacidad de unir  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

Tabla I.- Proteínas de membrana intestinal capaces de unir las ICPs de *Bacillus thuringiensis* en distintos insectos plaga

Insecto	Toxina	Receptor (kDa)	Referencia*
<i>Manduca sexta</i>	CryIA(a)	210	1
	CryIA(b)	210	1,2
	CryIA(c)	210, 120	1,3,4,5
	CryIC	106	13
<i>Pieris brassicae</i>	CryIA(c)	125	3
<i>Heliothis virescens</i>	CryIA(a)	170	8,9
	CryIA(b)	170	8,9
	CryIA(c)	140, 120	8,9
		155, 120, 103, 90, 63	6
	CryIC	68, 50 40	3 8
<i>Spodoptera littoralis</i>	CryIA(a)	160	9
	CryIA(b)	160	9
	CryIA(c)	125, 115 (120), 40	9 7
	CryIC	40	7,9
<i>Spodoptera exigua</i>	CryIA(a)	200, 180	9
	CryIA(b)	200, 180	9
	CryIA(c)	130, 115	9
	CryIC	40	9
<i>Spodoptera frugiperda</i>	CryIA(c)	148	6
<i>Lymantria dispar</i>	CryIA(c)	120	10
<i>Tenebrio molitor</i>	CryIIIA	144	11
<i>Anopheles stephensi</i>	CryIVD	148	12
<i>Tipula oleacea</i>	CryIVD	78	12

\* 1) Martínez-Ramírez *et al.* (1994); 2) Vadlamudi *et al.* (1993); 3) Knowles *et al.* (1991)  
4) Knight *et al.* (1994); 5) Sangadala *et al.* (1994); 6) Garczynski *et al.* (1991); 7) Sanchis y Ellar  
(1993); 8) Oddou *et al.* (1991); 9) Oddou *et al.* (1993); 10) Valaitis *et al.* (1995); 11) Belfiore *et al.*  
(1994); 12) Feldmann *et al.* (1995); 13) Luo *et al.* (1996)

No se conoce mucho acerca de la naturaleza molecular de estas proteínas capaces de unir las toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Su condición de glicoproteína se dedujo a partir del tratamiento de vesículas de membrana con glicosidasas o la adición de azúcares previamente a la realización de experimentos de unión de Cry1B en *Pieris brassicae* (Hofmann *et al.*, 1988a), de Cry1Ab en *Manduca sexta* (Hendrickx, 1992) y de ICPs de *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* en *Bombyx mori* y *Spodoptera littura* (Indrasith y Hori, 1992). Se desconoce si las cadenas de azúcares están implicadas directa o indirectamente en la unión de las toxinas, ya sea constituyendo parte del epitopo de unión o manteniendo la estructura de las proteínas de unión. Además, tampoco se conoce si estos carbohidratos se encuentran unidos al receptor por una N- ó O-glicosilación (Knight *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1995; Denolf *et al.*, 1996) o bien forman parte de un anclaje tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI), que facilite la agregación de toxina y la inserción en la membrana de borde en cepillo del intestino del insecto (Garczynski y Adang, 1995). Este último tipo de anclaje ha sido descrito para las proteínas de membrana que unen Cry1Ac en *Manduca sexta* (Knight *et al.*, 1995; Garczynski y Adang, 1995; Masson *et al.*, 1995b; Luo *et al.*, 1996) y *Lymantria dispar* (Lee *et al.*, 1996), así como para las proteínas de unión de Cry1Ab en *Manduca sexta* y *Plutella xylostella* (Denolf *et al.*, 1996).

Hasta el momento, se ha logrado la identificación de dos tipos de moléculas que pueden funcionar como receptores de ICPs en la membrana intestinal de los insectos. Por una parte, una glicoproteína tipo cadherina de 210 kDa que une Cry1Ab en *Manduca sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1995), cuya función en el epitelio intestinal del insecto es desconocida. El segundo tipo de receptores de ICP corresponde a proteínas del tipo aminopeptidasas-N. Este es el caso de las proteínas de 120 kDa que unen Cry1Ac en el intestino de *Manduca sexta* (Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1995), *Heliothis virescens* (Gill *et al.*, 1995) y *Lymantria dispar* (Lee *et al.*, 1996). También la proteína de 120 kDa a la que se une Cry1Ab en *Manduca sexta* (Denolf *et al.*, 1996) y una proteína homóloga del intestino de *Plutella xylostella* (Denolf *et al.*, 1996), así como la proteína de 106 kDa que une Cry1C en *Manduca sexta* (Luo *et al.*, 1996) pertenecen a la familia de las aminopeptidasas-N. *In vivo*, parece ser que estas enzimas contribuyen a la hidrólisis de proteínas parcialmente digeridas en el intestino (Lee y Amstee, 1995; Udenfriend y Kodokula, 1995). Además, como las aminopeptidasas-N en mamíferos están involucradas en el transporte de aminoácidos dependientes de Na<sup>+</sup> (Plakidou-Dimock *et al.*, 1993), se ha especulado que el efecto de las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* sobre el transporte de aminoácidos dependiente de K<sup>+</sup> esté mediado por este tipo de proteínas (Denolf, 1997).

### 3.- Formación del poro

Tras unirse a un receptor específico, las ICPs se insertan irreversiblemente en la membrana plasmática de la célula (Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990a). El paso siguiente implica la formación de un poro o lesión en la membrana, lo que conduce a la ruptura de la barrera de permeabilidad de la misma y a la lisis celular. La confirmación de que estos poros se pueden producir se ha realizado mediante estudios con bicapas lipídicas y varias toxinas (Knowles *et al.*, 1989; Slatin *et al.*, 1990) y estudios de perfusión luminal *in vitro* (Peyronnet *et al.*, 1997). Sin embargo, se desconoce aún si estos poros son inespecíficos, selectivos únicamente para el tamaño de las moléculas a las que permiten el paso (Knowles y Ellar, 1987), o específicos para K<sup>+</sup>, como parecen indicar los experimentos realizados por Sacchi *et al.* (1986) en *Pieris brassicae*, en los que el transporte de aminoácidos a través de las vesículas, que es dependiente del gradiente de K<sup>+</sup>, es inhibido por las proteínas Cry.

Se han propuesto tres modelos para el papel de los receptores de ICPs de *Bacillus thuringiensis* en relación al mecanismo de formación de canales iónicos (Knowles y Dow, 1993):

- El receptor es por sí mismo un canal transmembrana que puede ser abierto por la toxina. En este caso se esperaría observar una correlación directa entre unión de la toxina y formación del poro, pero esta relación no se cumple para todas las ICPs. Como ya hemos indicado, algunas toxinas manifiestan alta afinidad por vesículas del intestino de insectos para las que no son tóxicas (Wolfesbesrger, 1990; Garczynski *et al.*, 1991).

- La toxina junto con el receptor forma un poro. Existen ciertas evidencias de que Cry1Ac es capaz de formar poros cuando se inserta en bicapas lipídicas, y que estos poros son diferentes cuando lo hace en presencia de proteínas de vesículas de *Manduca sexta* (Knowles y Dow, 1993).

- El receptor cataliza la asociación de la toxina y su inserción en la membrana, pero no juega ningún otro papel en la formación del poro.

Para este modelo existen dos posibilidades:

1. El receptor actúa simplemente como un punto de anclaje para la toxina, aumentando su concentración en la superficie de la membrana.

2. La unión al receptor produce un cambio conformacional en la toxina que la capacita para insertarse en la membrana. Este modelo implicaría que el receptor sería esencial para la formación del poro y que la toxina no podría insertarse en la membrana sin el cambio conformacional.

Existen evidencias a favor de los tres modelos, pero mientras no se purifique un receptor funcional y se caracterice su interacción con las toxinas será muy difícil decantarse por uno de ellos.

### 3.5 Ensayos de toxicidad con las ICPs de *Bacillus thuringiensis*

La toxicidad de los insecticidas en general se ha estimado hasta ahora mediante bioensayos en los que el efecto del incremento de las dosis se expresa como una curva dosis-mortalidad. Estas curvas tienen una forma sigmoidal pero se pueden convertir en líneas rectas asumiendo el modelo probit (Finney, 1962), que representa las dosis expresadas en logaritmos frente a la mortalidad expresada en "probits". El efecto de la mortalidad del insecticida se expresa en términos de  $LD_{50}$  (dosis que provoca la muerte de la mitad de los individuos sujetos a prueba) y se caracteriza por la pendiente de la recta obtenida. Esta pendiente indica el grado de variabilidad en respuesta al tratamiento dentro de la población de insectos. Cuanto más baja sea la pendiente, más alta es la variabilidad y esto significa que generalmente se requieren grandes cantidades del agente de control para producir una mortalidad del 100%.

En el caso concreto de *Bacillus thuringiensis*, los ensayos de toxicidad y la determinación de la  $LD_{50}$  y la pendiente de las curvas dosis mortalidad, tanto de las ICPs individuales como de los productos comerciales, han resultado de gran utilidad en la cuantificación de la toxicidad de nuevas cepas o formulaciones, en la detección del desarrollo de resistencia y en la estima periódica de la actividad de los formulados comerciales para determinar su potencia y asegurar la producción estandarizada de los mismos (Dulmage, 1975). En la Tabla II se muestra la toxicidad de diferentes toxinas del grupo CryIA en varias especies de plagas forestales..

**Tabla II.- Toxicidad de la cepa HD-1 y proteínas CryIA, expresadas como FFD<sub>50</sub> ("Frass failure dose") en siete especies forestales. Cf: *Choristoneura fumiferana*, Co: *Choristoneura occidentalis*, Cp: *Choristoneura pinus*, Ol: *Orgyia leucostigma*, Ld: *Lymantria dispar*, Md: *Malcosoma disstria* y Af: *Actebia fennica*.**

Species	Toxin	No. of larvae (no. of dilutions)	Slope $\pm$ SE	FFD <sub>50</sub> (ng of toxin protein/larva)	Confidence limit 95%	
					Lower	Upper
Cf	HD-1	220 (10)	1.84 $\pm$ 0.21	16.8	12.5	22.2
	CryIA(a)	200 (8)	2.32 $\pm$ 0.29	12.6	8.4	18.6
	CryIA(b)	160 (8)	2.26 $\pm$ 0.29	13.2	10.0	17.2
	CryIA(c)	220 (9)	1.41 $\pm$ 0.17	27.9	19.2	40.2
Co	HD-1	170 (6)	1.83 $\pm$ 0.26	18.1	13.4	27.0
	CryIA(a)	250 (11)	1.28 $\pm$ 0.13	11.6	6.2	19.5
	CryIA(b)	190 (9)	1.56 $\pm$ 0.21	10.8	5.5	19.6
	CryIA(c)	210 (9)	1.53 $\pm$ 0.18	57.6	41.6	82.4
Cp	HD-1	160 (7)	2.19 $\pm$ 0.30	13.1	8.5	19.2
	CryIA(a)	150 (7)	1.67 $\pm$ 0.24	9.2	1.8	19.8
	CryIA(b)	160 (7)	2.63 $\pm$ 0.35	17.3	11.7	24.9
	CryIA(c)	160 (7)	2.28 $\pm$ 0.30	37.4	28.5	48.7
Ol	HD-1	220 (9)	1.40 $\pm$ 0.18	93.8	44.3	162.9
	CryIA(a)	250 (9)	1.10 $\pm$ 0.14	52.6	36.2	76.3
	CryIA(b)	230 (10)	1.49 $\pm$ 0.16	25.0	15.1	40.1
	CryIA(c)	180 (8)	1.56 $\pm$ 0.28	560	270	986
Ld	HD-1	160 (8)	1.59 $\pm$ 0.24	28.6	19.2	40.0
	CryIA(a)	190 (8)	1.37 $\pm$ 0.18	56.2	27.9	102.9
	CryIA(b)	180 (9)	2.07 $\pm$ 0.25	22.0	16.6	28.9
	CryIA(c)	90 (6)	2.87 $\pm$ 0.71	2,484	1,873	3,240
Md	HD-1	230 (10)	1.39 $\pm$ 0.19	24.0	15.9	35.0
	CryIA(a)	160 (7)	1.08 $\pm$ 0.19	36.9	12.5	83.2
	CryIA(b)	160 (7)	1.66 $\pm$ 0.24	25.5	15.1	39.6
	CryIA(c)	210 (10)	1.25 $\pm$ 0.16	26.5	11.8	51.8
Af	HD-1	50 (1)		>3,500		
	CryIA(a)	50 (1)		>3,500		
	CryIA(b)	50 (1)		>3,500		
	CryIA(c)	50 (1)		>3,500		

La potencia de los preparados comerciales basados en *Bacillus thuringiensis* se determina mediante la realización de ensayos paralelos del producto y de un estándar, que actualmente es la cepa HD-1-S-1980 para *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, con larvas de cuatro días de *Trichoplusia ni* en dieta artificial (Beegle *et al.*, 1986). La potencia es el ratio de la LC<sub>50</sub> del estándar respecto del producto evaluado, multiplicado por la potencia definida para el estándar en Unidades Internacionales (IU):

$$LC_{50} \text{ (HD-1-S-1980)} / LC_{50} \text{ (producto)} \times 16000 \text{ IU/mg} = \text{Potencia del producto}$$

Según el objetivo del estudio y la información que se deseaba obtener, para optimizar la eficacia de los ensayos de toxicidad de *Bacillus thuringiensis* en distintos insectos plaga, se han desarrollado numerosas alternativas en las que se contemplan variaciones en los estadios de las larvas tratadas (primeros o últimos), modo de ingestión (en dieta natural o artificial, o mediante ingestión forzada) o efecto evaluado (mortalidad, ausencia de deposiciones, pérdida de peso, inhibición de la muda, etc.).

### 3.6 Resistencia a las ICPs de *Bacillus thuringiensis*

La resistencia a insecticidas, entendida como el proceso de selección y adaptación genética que permite a una población escapar al control, puede ser uno de los mayores problemas a los que se enfrente la agricultura y la salud pública en el próximo siglo. Cada tipo de insecticida nuevo que se ha utilizado ha producido, en más o menos tiempo, la adaptación de los insectos plaga a sus efectos, de manera que en la actualidad, se han descrito más de quinientas especies de artrópodos resistentes a algún insecticida (Georghiou y Lagenes, 1988). La resistencia tiene como resultado un incremento en las frecuencias de aplicación de los plaguicidas, así como el aumento de las dosis a utilizar, lo que disminuye su rendimiento y produce un mayor daño al medio ambiente. Por esto, cada vez está más clara la necesidad del planteamiento de estrategias de uso de los insecticidas que impidan o retrasen la aparición de resistencias.

Respecto al desarrollo de resistencia, *Bacillus thuringiensis* no es diferente de los otros insecticidas, y después de aproximadamente 30 años de su uso continuado en el control de plagas, ya se ha detectado la aparición de resistencia en ciertas zonas (Stone *et al.*, 1991; Tabashnik, 1994).

La única especie que, de momento, ha desarrollado resistencia a *Bacillus thuringiensis* en el campo es *Plutella xylostella*, detectándose poblaciones naturales resistentes en Hawaii, Filipinas, Florida, Japón, Malasia, Tailandia (Tabashnik *et al.*, 1994) y América Central (Pérez y Shelton, 1997). Además, experimentos de selección en el laboratorio han demostrado que pueden desarrollar resistencia a *Bacillus thuringiensis* otras especies como: *Plodia interpunctella* (McGaughey, 1985a y b), *Heliothis virescens* (Stone *et al.*, 1989; MacIntosh *et al.*, 1991; Gould *et al.*, 1992), *Trichoplusia ni* (Estada y



Ferré, 1994); *Leptinotarsa decemlineata* (Whalon *et al.*, 1993), *Lobesia botrana* (Piedrafita, 1996), etc.

### 3.6.1 Mecanismos de resistencia a *Bacillus thuringiensis*

El mecanismo por el que un insecto desarrolla resistencia a una cierta toxina está inevitablemente ligado a su modo de acción. En el caso de *Bacillus thuringiensis*, este modo de acción es complejo y consta de varios pasos, de manera que la alteración en alguno de ellos podría conducir al desarrollo de resistencia. Así, cambios en el fluido intestinal (composición iónica, pH, etc.) podrían afectar a los procesos de solubilización de las ICPs. De igual manera, alteraciones en la proteólisis o activación de las toxinas, en las proteínas receptoras de las  $\delta$ -endotoxinas, o en otras asociadas a ellas, o en la membrana peritrófica del insecto (que actúa como filtro antes de la unión toxina-receptor), etc., podrían dar como resultado una disminución de la susceptibilidad de los insectos a estas toxinas.

Los mecanismos bioquímicos de resistencia a *Bacillus thuringiensis* descritos hasta el momento se pueden clasificar en tres grupos, según el paso del modo de acción al que afectan:

#### 1.- Resistencia debida a modificaciones del sitio de unión de las ICPs al epitelio intestinal

Este es el caso de *Plodia interpunctella*, en la que se demostró que una cepa resistente obtenida mediante selección artificial presentaba una menor afinidad por Cry1Ab, aunque el número de sitios de unión de esta cepa no varió respecto de la cepa control (Van Rie *et al.*, 1990b). Este mismo mecanismo de resistencia se determinó para una población natural de *Plutella xylostella* de Filipinas, en la que no se consiguió unión específica de Cry1Ab ni a vesículas de intestino ni a secciones de tejido (Ferré *et al.*, 1991; Bravo *et al.*, 1992a). Así mismo, en una población de *Plutella xylostella* procedente de Hawaii, se demostró que la unión de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac a vesículas de membrana estaba altamente disminuida (Tabashnik *et al.*, 1994), y para una población de *Plutella xylostella* de Florida, ensayos de unión de Cry1Ab marcada con biotina a secciones de tejido intestinal, demostraron la incapacidad de unión de esta toxina (Denolf *et al.*, 1993b).

#### 2.- Resistencia debida a alteraciones en la proteólisis de las ICPs

Sólo se ha descrito un caso en una cepa resistente de *Plodia interpunctella*, en la que el contenido intestinal de los intestinos resistentes mostró una actividad proteolítica significativamente menor que el de los insectos susceptibles, y además la activación de la protoxina de Cry1Ac fue mucho más lenta (Oppert *et al.*, 1994).

#### 3.- Otros mecanismos

En el caso de distintas cepas resistentes de *Heliothis virescens*, no se ha podido demostrar una asociación clara entre la resistencia y la modificación de sitios de unión, o en

la actividad proteolítica del intestino (MacIntosh *et al.*, 1991; Gould *et al.*, 1992). En este insecto, pues, la resistencia debe de producirse por otros mecanismos, como la solubilización anómala de las protoxinas en el intestino o una menor susceptibilidad por parte del insecto a los procesos posteriores a la unión toxina-receptor, tales como la inserción de la ICP en la membrana o la formación del poro.

En poblaciones resistentes de *Plodia interpunctella* seleccionadas en el laboratorio, está alterada la unión de Cry1Ac a la membrana intestinal del insecto y sin embargo, la proteína receptora no ha sufrido modificaciones, sugiriendo que la restricción del acceso de Cry1Ac a sus sitios de unión en el epitelio intestinal puede ser la responsable de la resistencia en este caso (Mohammed *et al.*, 1996).

### 3.6.2 Genética de la resistencia a *Bacillus thuringiensis*

El conocimiento de la genética de la resistencia a insecticidas es esencial para desarrollar estrategias que retrasen su aparición.

Las bases genéticas de la resistencia a *Bacillus thuringiensis* se han investigado en varias especies de insectos, obteniéndose unos resultados variables dependiendo de la especie y de la población analizada.

En cinco colonias de *Plodia interpunctella* la resistencia era autosómica y desde parcialmente a totalmente recesiva, dependiendo de la cepa (McGaughey y Beeman, 1988).

En una colonia de *Plutella xylostella* derivada de una población natural de Hawaii, la herencia de la resistencia seguía un modelo de un único gen autosómico recesivo (Tabashnik *et al.*, 1992a). Igualmente, en una colonia del mismo insecto de Japón, la resistencia se debía a un único gen autosómico y parcialmente recesivo (Hama *et al.*, 1992), mientras que en una cepa de Filipinas, la resistencia se transmitía según un modelo de herencia autosómica recesiva e influenciada por algún tipo de efecto parental (Martínez-Ramírez *et al.*, 1995). Recientemente, otra colonia de *Plutella xylostella* también mostró herencia autosómica de la resistencia a Cry1C (Liu *et al.*, 1997).

En *Heliothis virescens*, la resistencia a Cry1Ab y Cry1Ac se heredó de forma autosómica (Gould *et al.*, 1992; Sims y Stone, 1991). La resistencia a Cry1Ab fue parcialmente dominante, mientras que la resistencia a Cry1Ac variaba desde la codominancia a la recesividad parcial.

En coleópteros, la resistencia a Cry3A en *Leptinotarsa decemlineata* se hereda de forma autosómica y parcialmente dominante (Rahardja y Whalon, 1995).

### 3.6.3 Manejo de la resistencia a *Bacillus thuringiensis*

Dado que es inevitable la aparición de poblaciones de insectos resistentes después de tratamientos prolongados con un producto, se han diseñado una serie de estrategias de aplicación de los insecticidas que permiten retrasar su aparición y disminuir la proporción de insectos no susceptibles. El éxito de estas tácticas depende de muchos parámetros, como

las características propias del insecticida, los insectos diana, la localización geográfica de la población, el tipo de cultivo, las bases genéticas de la resistencia, etc. (Marrone y MacIntosh, 1993). Todas estas estrategias, a su vez, se pueden alternar, combinar o solapar.

A continuación se resumen algunas de las estrategias que se pueden aplicar en el control de la resistencia a *Bacillus thuringiensis*:

### 1.- Rotaciones

Distintos insecticidas con diferente modo de acción son aplicados secuencialmente en el tiempo, de forma que, como la eficacia biológica de los individuos resistentes es supuestamente inferior a la de los susceptibles, y dada la baja probabilidad de que sean también resistentes para el segundo insecticida aplicado, se mantendrá una población estable de tamaño pequeño con sensibilidad para todas ellas. Son más eficaces las rotaciones del insecticida en diferentes generaciones de insectos y para los productos basados en *Bacillus thuringiensis*, este tipo de rotaciones sólo es posible para los preparados de la bacteria y no para las plantas transgénicas, que expresan la misma ICP durante toda la temporada.

### 2.- Mezcla de toxinas

Es otra estrategia posible, tanto utilizando plantas transgénicas como productos convencionales. Consiste en la aplicación de formulaciones que contengan dos o más tipos de ICPs con mecanismos de acción diferentes. De este modo es improbable encontrar individuos con una combinación génica que pueda hacer frente a la vez a todos ellos, con lo que difícilmente aparecen individuos resistentes.

No obstante, la resistencia cruzada a diferentes toxinas de *Bacillus thuringiensis* puede reducir la probabilidad de que las mezclas o las rotaciones sean realmente efectivas para retrasar la aparición de resistencia (McGaughey y Johnson, 1992).

### 3.- Sinergismo

Implica la utilización de un agente distinto del insecticida que junto con éste sea capaz de potenciar su toxicidad. En este caso, el control de resistencia a *Bacillus thuringiensis* puede contemplarse como un caso particular dentro del control integrado de plagas. A este nivel, se han descrito como efectivas las combinaciones de dosis subletales de *Bacillus thuringiensis* y virus de la polihedrosis nuclear (Tompkin *et al.*, 1986), dosis bajas de insecticidas químicos (Jaques y Morris, 1981; Pree y Daly, 1996), dosis subletales de piretroides (Svestka y Vankova, 1980; Mohamed *et al.*, 1983; Salama *et al.*, 1984), inhibidores del desarrollo (Dreistad y Dahlsten, 1989), etc.

### 4.- Refugios

El desarrollo y mantenimiento de refugios que aseguren la supervivencia de los insectos susceptibles puede ser también una buena táctica para controlar la resistencia. En

el caso de *Bacillus thuringiensis*, esta estrategia se puede llevar a cabo manteniendo ciertas zonas de los cultivos no tratados, o en el caso de la utilización de plantas transgénicas, mediante mezclas de plantas que expresen las toxinas con otras que no. También se pueden conseguir refugios mediante la expresión de los genes de las ICPs de forma específica de tejido o en el tiempo. Esta estrategia permite el mantenimiento de un mayor número de genotipos sensibles frente a los resistentes, produciendo en conjunto una mayor susceptibilidad de la población.

Como podemos ver, las posible técnicas para el control de la resistencia incluyen múltiples opciones, pero independientemente de la aproximación utilizada, el control de la resistencia a *Bacillus thuringiensis* es muy complejo y debe ser rigurosamente evaluado para poder aplicar este bioinsecticida de una forma racional y segura, que permita aprovechar al máximo su potencial.



## **II OBJETIVOS**

---



Los estudios llevados a cabo hasta ahora sobre la acción insecticida de *Bacillus thuringiensis* en plagas forestales propias de nuestro país se reducen básicamente a la realización de pruebas de campo y la comparación de las eficacias obtenidas. Sin embargo, estudios más completos del modo de acción específico de este patógeno frente a los insectos plaga de nuestros bosques permitirían optimizar su uso en gran medida.

Con objeto de abordar esta tarea planteamos este trabajo, cuyo objetivo principal es el estudio del control de dos plagas forestales que actualmente afectan a los bosques españoles: *Thaumetopoea pityocampa* (procesionaria del pino) y *Lymantria monacha* (mónaca) mediante la utilización de las proteínas cristalinas de efecto insecticida (ICPs) de *Bacillus thuringiensis*.

Para su realización, hemos desglosado el trabajo en tres objetivos más concretos:

- Determinación del grado de toxicidad de diversas delta-endotoxinas del grupo Cry1 y de varias formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* frente a las dos plagas forestales objeto de análisis.
- Estudio del modo de acción y las características de unión de las ICPs tóxicas en cada insecto.
- Evaluación de la eficacia en campo frente a estas dos plagas forestales de distintos productos comerciales basados en *Bacillus thuringiensis*.





### **III MATERIAL Y MÉTODOS**

---



### 1. Material biológico utilizado

Las larvas de *Thaumetopoea pityocampa* con las que se realizó el trabajo fueron recogidas directamente de la naturaleza en diversas zonas de la Comunidad Valenciana que nunca habían estado en contacto con insecticidas basados en las toxinas de *Bacillus thuringiensis*, pertenecientes a los términos de Paterna, Bétera y Ademuz.

Los huevos de *Lymantria monacha* fueron recolectados de dos poblaciones naturales diferentes: Orihuela del Tremedal (Teruel, España) y Brandemburg (Alemania). Estas últimas fueron amablemente cedidas por el Dr. Gruppe, del Departamento de Zoología Aplicada de la Facultad de Ciencias Forestales de la Ludwig-Maximilians-Universität München.

### 2. Mantenimiento de las poblaciones de *Lymantria monacha* en el laboratorio

Los huevos de *Lymantria monacha* recogidos en el campo fueron almacenados a 4°C hasta su utilización. Para iniciar el ciclo biológico de este insecto, los huevos, previa desinfección con formaldehído, se depositaron en una cámara en condiciones de 25°C y 70% de humedad para facilitar la eclosión. Las larvas de primer a tercer estadio fueron alimentadas con la dieta artificial publicada por Grijpma *et al.* (1987), de la que se omitió la aureomicina, por considerarse incompatible con *Bacillus thuringiensis* (Pérez-Guerra, 1995). A partir de tercer estadio hasta el momento de pupación, las larvas fueron alimentadas con *Pinus halepensis* procedente del vivero de la Generalitat Valenciana de Quart de Poblet.

Las pupas recogidas fueron introducidas en una caja de poblaciones, donde se mantuvieron los adultos y se realizaron las puestas.

Los huevos recolectados en el laboratorio debieron permanecer un mínimo de tres meses a 4°C antes de ser colocados a 25°C para iniciar un nuevo ciclo biológico.

La duración del ciclo biológico de este insecto en el laboratorio es aproximadamente de tres meses.

### 3. ICPs de *Bacillus thuringiensis* y formulaciones comerciales

Las proteínas cristalinas de efecto insecticida de *Bacillus thuringiensis* de tipo Cry1 purificadas y activadas según se describe en Höfte *et al.* (1986) fueron proporcionadas, en una colaboración previa, por la empresa de biotecnología Plant Genetic Systems (Gante, Bélgica).

Las formulaciones insecticidas fueron suministradas por las casas proveedoras correspondientes, y fueron las siguientes:

- **Dipel LA** (Abbot), con 16.55 BIU/L ( $10^6$  Unidades Internacionales/L), contiene esporas de la serovariedad *kurstaki*, sin especificar qué cepa ni qué proteínas insecticidas individuales.
- **Foray 48B** (Novo Nordisk), suministrada por Aragonesas S.A., contenía 12.7 BIU/L de la variedad *kurstaki*, sin especificar qué cepa ni qué proteínas insecticidas individuales.
- **Foray 76B** (Novo Nordisk), suministrada también por Aragonesas S.A., contenía 20 BIU/L, sin concretar composición.
- **Cordalene** (Ecogen), suministrada por Agrichem, con 7.5 BIU/L de *Bacillus thuringiensis* correspondiente a la cepa EG 2348, variedad *kurstaki*.

#### 4. Ensayos de toxicidad

Los ensayos de toxicidad en *Thaumetopoea pityocampa* se realizaron con larvas de primer estadio. Para el tratamiento, ramilletes de acículas de pino (*Pinus sylvestris*) se sumergieron durante 8 min en cada una de las diluciones de las dosis a ensayar y se dejaron secar durante un tiempo antes de ponerse en contacto con las larvas de procesionaria. En todos los casos, se contó con un control de acículas empapadas en agua. Cuatro días después del tratamiento, se realizó un primer conteo de supervivientes que fueron traspasados a pino sin tratar, y se volvieron a contar cuatro días más tarde en un segundo conteo definitivo.

Cada ensayo constó de 5 dosis distintas de ICP (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1E) o de formulación comercial disueltas en PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) con BSA 0.1%, con 2 réplicas por dosis y 20 L1 por réplica. Los resultados se analizaron mediante análisis probit (Finney, 1962), utilizando el programa estadístico POLO-PC (LeOra Software, 1987) que nos proporcionó las dosis letales necesarias para matar al 50% y al 90% de la población ( $\text{LD}_{50}$  y  $\text{LD}_{90}$ , respectivamente) y la curva de mortalidad de la población.

Siguiendo el mismo protocolo se llevaron a cabo ensayos de toxicidad con Cry1Ab (1.0 ng/ $\mu\text{l}$ , 10.0 ng/ $\mu\text{l}$ ) y Cry1Ac (0.4 ng/ $\mu\text{l}$ , 4 ng/ $\mu\text{l}$ ) en larvas de procesionaria de segundo estadio tardías. Las dosis 1.0 ng/ $\mu\text{l}$  de Cry1Ab y 0.4 ng/ $\mu\text{l}$  de Cry1Ac fueron también ensayadas en larvas de tercer estadio.

Los ensayos de toxicidad con *Lymantria monacha* se llevaron a cabo con larvas de tercer estadio recién mudadas. Para ello, se colocaron en placas de bioensayos con 24 pocillos circulares de 2 cm<sup>2</sup> de superficie (24-well cluster plate, Costar, USA) que contenían dieta artificial. En los ensayos con bioinsecticidas (Dipel ES y Foray 48B), se utilizaron 5 dosis con 2 réplicas de 20 L2 por dosis. Las diluciones de los productos se dispusieron en la

concentración adecuada sobre la dieta artificial (50 µl) y una vez seco, se colocó una larva en cada pocillo. Después de cinco días, se realizó el conteo de las larvas que habían sobrevivido al tratamiento.

En los ensayos con ICPs (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac), se utilizaron larvas de segundo estadio recién mudadas y se aplicaron 3 dosis subletales, con 2 réplicas de 20 L2 por dosis. Tras los 5 días de tratamiento, se contabilizó el número de larvas que había mudado a L3.

En todos los casos se dispuso de controles con dieta artificial sin tratar, y el análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo como en los ensayos de toxicidad en *Thaumetopoea pityocampa*.

## 5. Preparación de tejido y obtención de secciones histológicas

La fijación de tejido y la preparación de secciones para microscopía óptica se realizó según el método de Bravo *et al.* (1992a y 1992b). El intestino de larvas de primer, segundo o tercer estadio de los dos insectos-plaga estudiados se disecó y se fijó en el sublimado de Bouin Holland (acetato de cobre 2.5%, ácido pícrico 4%, formaldehído 10% y cloruro de mercurio saturado 10%). Después de 30 min de incubación en esta solución, el tejido se transfirió a fijador nuevo durante 24 h y después se lavó con agua durante 12 h. El tejido intestinal se deshidrató en etanol 70% durante 1 h, etanol 96% 1 h, dos veces en etanol 100% 2 h y se incluyó 1 h en xileno:etanol 100% 50:50 (v/v), 1 h en xileno y finalmente a 56°C, 12 h en xileno:paraplast 50:50 (v/v) y 48 h en paraplast 100%. Los bloques de paraplast con el tejido incluido se formaron por enfriamiento rápido a 4°C.

Para la obtención de secciones transversales de 5 µm se utilizó un microtomo Microm HM-330. Los cortes seriados de parafina se extendieron sobre portaobjetos recubiertos de una solución de poli-L-lisina (1 mg/ml).

## 6. Tinción de azocarmina de Heidenhains

Las secciones de tejido intestinal se desparafinaron e hidrataron tal y como se describe en el apartado anterior. La tinción del tejido con el método de Heidenhains se realizó según se describe en Bravo *et al.* (1992b).

Las preparaciones se incubaron en una solución de azocarmina G (0.1% en ácido acético 1.5%), durante 60 min a 58°C y a continuación 10 min a 20°C. Tras un lavado de 1 min con agua destilada, las preparaciones se trasvasaron a una solución de anilina 1% en etanol 70% durante 1 min. Tras 1 min de incubación en etanol ácido (1% de ácido acético en etanol 70%) y 1 min en agua, el tejido se incubó sucesivamente 1 h en ácido fosfotúngstico 5%, 1 min en agua y 1 h en la solución de Heidenhains (azul de anilina 0.5%,

naranja G 2%, ácido acético 8%, diluida 1:3 (v/v) en agua destilada). Las preparaciones se deshidrataron y se montaron con Entellan (Merck).

### **7. Intoxicación de larvas de *Thaumetopoea pityocampa* y *Lymantria monacha* con las ICPs de *Bacillus thuringiensis***

Larvas de *Thaumetopoea pityocampa* de primer estadio fueron mantenidas 16 h sin comida y posteriormente alimentadas con ramilletes de acículas sumergidos en dos diluciones diferentes de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B y Cry1C, de concentraciones 10 ng/μl y 1 μg/μl respectivamente. Larvas alimentadas con acículas empapadas en tampón PBS/ BSA 0.1% constituyeron el control de la experiencia. Tres horas 30 minutos más tarde, las larvas fueron disecadas y los intestinos obtenidos fijados y cortados en secciones tal como se describe en el apartado 5 de Material y Métodos. Las secciones fueron posteriormente teñidas según se describe en el apartado 6 de Material y Métodos.

Larvas de *Lymantria monacha* de tercer estadio recién mudadas fueron mantenidas de 12 a 24 h sin comida y posteriormente forzadas a ingerir una gota de 0.5 μl de las diluciones utilizadas en la intoxicación (3.2 ng/μl y 3.2 μg/μl). Se realizaron ensayos de intoxicación con las ICPs Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, y las dosis ingeridas por las larvas fueron de 1.6 ng (para las tres toxinas) y 1.6 μg (sólo para Cry1Ab). Dos horas después de la intoxicación, las larvas fueron disecadas y los intestinos obtenidos se fijaron, cortaron y tiñeron tal como aparece descrito en los apartados 5 y 6 de la sección Material y Métodos. El mismo protocolo se siguió para las larvas control, sin intoxicar.

### **8. Detección *in vitro* de la unión de ICPs sobre secciones de tejido intestinal**

Se detectó la unión *in vitro* de las ICPs Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B a secciones de tejido intestinal de los dos insectos-plaga estudiados. En *Thaumetopoea pityocampa*, además, también se estudió la unión de Cry1C y Cry1E.

Tras el desparafinado e hidratación del tejido, dos veces 3 min con xileno 100%, tres veces 3 min con etanol absoluto y una vez 1 min con agua destilada, las secciones se sumergieron dos veces durante 2 min en lugol (I<sub>2</sub> 0.5% y KI 1% en agua destilada) para eliminar el HgCl<sub>2</sub>, y a continuación 2 min en tiosulfato sódico al 5%. Las secciones se lavaron en agua destilada y se equilibraron durante 5 min en tampón TST (Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, timerosal 1mM, pH 7.6, Triton X-100 0.1%).

Se bloqueó la unión inespecífica cubriendo las secciones con 500 μl de TST/ 3% BSA durante 1 h. Posteriormente, las secciones del tejido se incubaron durante 1 h con 300 μl de la ICP correspondiente (20 μg/ml diluido en TST). Se eliminó el exceso de toxina

lavando con 500 µl de TST. A continuación, se incubaron con 300 µl de anticuerpo monoclonal específico contra la ICP (1 µg/ml en TST) durante toda la noche. Tras lavar con 500 µl de TST, se incubaron con 300 µl de una dilución 1:7500 en TST de anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Después de lavar con 500 µl de TST, la reacción de color se desarrolló en tampón Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9.5, utilizando como sustratos NBT (cloruro de 4-nitro-tetrazolio) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato). Finalmente, las preparaciones se deshidrataron (30 en etanol 70%, 2 veces en etanol 100% 3 min, 2 veces en xileno 3 min) y se montaron con Entellan (Merck) para su observación al microscopio.

### 9. Obtención de tejido intestinal y preparación de BBMV

Tanto para *Thaumetopoea pytiocampa* como para *Lymantria monacha*, para la preparación de BBMV se utilizaron larvas de dos momentos distintos a lo largo del desarrollo: por una parte, larvas de primer estadio tardías y de segundo estadio recientes, y por otra, larvas de últimos estadios. La preparación de vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV) se llevó a cabo según el método de Wolfesberger *et al.* (1987). Las BBMV de procesionaria en ambos estadios, así como las de *Lymantria monacha* de primer-segundo estadio fueron preparadas a partir de larvas enteras (Escriche *et al.*, 1995a). La preparación de BBMV de últimos estadios de *Lymantria monacha*, sin embargo, se realizó con intestinos disecados. Para ello, las larvas se inmovilizaron manteniéndose en hielo durante 10 min. El intestino se disecó en tampón MET (manitol 300 mM, EGTA 5 mM, Tris/HCl 17 mM, pH 7.5), eliminándose su contenido y congelándose a -80°C hasta su posterior utilización.

Para la preparación de BBMV, las larvas enteras o los intestinos disecados, según fuera el caso, se homogeneizaron en 9 volúmenes de tampón MET y se añadió el mismo volumen de MgCl<sub>2</sub> 24 mM. La mezcla se mantuvo en hielo durante 15 min y se centrifugó a 1600 g 15 min a 4°C. El sobrenadante así obtenido fue centrifugado a 20000 g durante 30 min a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió entonces en la mitad del volumen inicial de tampón MET y se volvió a repetir el tratamiento con MgCl<sub>2</sub> y los pasos de centrifugación anteriormente descritos. El último precipitado que se obtuvo constituyó la preparación de vesículas, se resuspendió en MET:agua 1:1 y se repartió en alícuotas que se guardaron a -80°C. La concentración de proteínas de las vesículas se determinó por el método de Bradford (1976).



## 10. Biotinilación de ICPs

La biotinilación de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se realizó conforme al protocolo recomendado por el fabricante del kit de biotinilación utilizado (Amersham, Buckinghamshire, UK). Para ello, se incubaron 0.2 mg del agente de conjugación BNHS (biotinil-N-hidrosuccinamida éter) con 1 mg de ICP en tampón bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 100 mM pH 9) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. La separación de la ICP del reactivo se realizó eluyendo con tampón bicarbonato en una columna de 9 ml de Sephadex G-25, previamente equilibrada con 25 ml de tampón bicarbonato. Se recogieron fracciones de 500  $\mu\text{l}$  y se determinó en qué fracción se encontraba la ICP biotinilada midiendo la absorbancia de las fracciones a 280 nm y 260 nm.

## 11. Ensayos de unión ICP biotinilada-receptor con detección ECL (Enhanced Chemical Luminescence)

Las BBMVs se descongelaron inmediatamente antes de ser utilizadas y se centrifugaron a 15000 g durante 5 min a 4°C para sedimentar las proteínas, reemplazándose el tampón inicial en el que estaban resuspendidas las vesículas por PBS/BSA 0.1%.

Los componentes de la reacción se añadieron en el siguiente orden: tampón PBS/BSA 0.1%, ICP biotinilada (10 ng) y vesículas de membrana (10  $\mu\text{g}$ ). Para la realización de competencias, se añadió a la mezcla de reacción un exceso de ICP no marcada (1  $\mu\text{g}$ ), previamente a la adición de la ICP biotinilada y las vesículas de membrana. El volumen final del ensayo fue de 100  $\mu\text{l}$  y la incubación de la mezcla de reacción se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se paró centrifugando 15 min a 15000 g para eliminar la ICP no unida a vesículas. El sedimento se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de tampón PBS/BSA 0.1% y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones anteriores.

El sedimento se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra para electroforesis (Tris 100 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, DTT 100 mM y azul de bromofenol 0.01%) y se hirvió durante 5 min. La electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS de las muestras se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970), a 4°C, en geles de un porcentaje de acrilamida del 10%. A continuación se realizó un "western-blotting", transfiriéndose las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schüll) mediante el sistema semiseco de LKB. El sistema de transferencia estaba constituido por tres hojas de papel Wathman 3MM empapadas en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%), la membrana de nitrocelulosa, el gel y tres capas más de papel Wathman, todo empapado en tampón. Todos los componentes se

cortaron con el mismo tamaño del gel y las proteínas fueron transferidas en condiciones de intensidad constante ( $0.8 \text{ mA/cm}^2$ ) durante 2 h. La eficiencia de la transferencia se determinaba tras tinción de las proteínas en la membrana con Ponceau S (Sambrook *et al.*, 1987).

La unión no específica al filtro se bloqueó incubando la membrana durante 2 h en tampón TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) con Tween 20 al 2% (TBST). A continuación se incubó la membrana con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) diluida 1:3000 (v/v) en TBS durante 45 min. Se lavó el exceso de estreptavidina con tampón TBST (4 veces, 5 min y 1 vez 15 min) y se añadió el reactivo de ECL. Finalmente, el filtro se secó y se expuso a una película Kodak X-Omat de rayos X.

## 12. Marcaje con $\text{Na}^{125}\text{I}$ de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac

El marcaje de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se realizó utilizando cloramina-T (van Rie *et al.*, 1989). A  $20 \mu\text{g}$  de estas ICPs se añadieron secuencialmente 1 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  ( $3.7 \text{ mBq}/\mu\text{l}$ ) y  $25 \mu\text{g}$  de cloramina-T en tampón PBS. Después de 60 s se paró la reacción añadiendo  $53 \mu\text{g}$  metabisulfito de sodio en agua y  $\frac{1}{4}$  del volumen total de NaI 1 M.

Para eliminar el yodo libre, la mezcla final se aplicó a una columna ( $17 \times 1.7 \text{ cm}$ ) de exclusión molecular BioGel P-30 (Bio-Rad). La elución de la ICP marcada se realizó con tampón PBS/BSA 0.1%. La radiactividad de las fracciones eluidas se midió con un contador gamma (Compugamma 1282, LKB). Las fracciones radiactivas que eluían al principio y que supuestamente contenían la proteína marcada se analizaban mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, y se detectaban exponiendo al gel, una vez seco, una película de autorradiografía Kodak X-Omat.

## 13. Determinación de la actividad específica $^{125}\text{I}$ -ICP

La actividad específica de la proteína marcada se determinó mediante la técnica de ELISA (Voller *et al.*, 1976). Para recubrir la placa de ensayo se utilizó un anticuerpo policlonal contra la ICP. Una vez unida ésta, se completó el "sandwich" con un anticuerpo monoclonal. La detección del complejo anticuerpo policlonal-ICP-anticuerpo monoclonal se realizó mediante la incubación con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma). Como sustrato de la fosfatasa se utilizó p-nitrofenilfosfato (Sigma). El producto de la reacción enzimática se midió en un fotómetro Titertek Multiskan MCC a una longitud de onda de 405 nm.

La concentración de toxina marcada se determinó con una recta patrón obtenida con la misma proteína no marcada. Las actividades específicas obtenidas fueron las

siguientes: 5.17 mCi/mg para Cry1Aa, 36.05 mCi/mg para Cry1Ab y 3.46 mCi/mg para Cry1Ac.

#### 14. Ensayos de unión ICP-receptor

Las BBMV's se descongelaron inmediatamente antes de ser utilizadas y se centrifugaron a 15000 g durante 5 min a 4°C para precipitar las proteínas. El tampón en el que estaban resuspendidas las vesículas se reemplazó por PBS/BSA 0.1%.

Para los ensayos de unión receptor-ligando los componentes de la reacción se añadieron en el siguiente orden: tampón PBS/BSA 0.1%, <sup>125</sup>I-ICP y proteínas de vesículas. Para la realización de competencias, se añadió un exceso de ICP no marcada, previamente a la adición de la ICP radiactiva y las proteínas de vesículas. El volumen final en el ensayo fue de 100 µl y la incubación de los componentes se realizó a temperatura ambiente. Todas las muestras se incubaron por duplicado.

Las reacciones se pararon por filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F, previamente incubados durante 1 h en PBS/0.5% BSA. La filtración se realizó en una unidad múltiple de filtración de Millipore (1225 Unit) conectada a una bomba de vacío. Una vez en el filtro, la muestra se lavaba inmediatamente con 5 ml de PBS pH 7.4/BSA 0.1% frío. Los filtros, en los que quedaba retenida la toxina radiactiva unida a las vesículas, se transferían a microtubos de los que se contaba la radiactividad en un contador gamma (Compugamma 1282, LKB) durante 1 min.

Los resultados de la unión al filtro se analizaron mediante el programa de ordenador LIGAND (Mundson y Rodbard, 1980).

#### 15. Medidas electrofisiológicas en intestinos de *Lymantria monacha*: Técnica de perfusión luminal

##### 15.1 Soluciones salinas e ICPs ensayadas

La composición de las soluciones del baño y luminal fue la misma: KCl 32 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, sacarosa 166 mM y Tris-HCl 5mM (pH 8.0), según Peyronnet *et al.* (1997). Las soluciones preparadas se filtraron con filtros Millipore de 0.22 µm y fueron mantenidas a 4°C hasta su utilización.

Las toxinas ensayadas, diluidas en la solución control, fueron las siguientes: Cry1Ab (1µg/ml, 10 µg/ml), Cry1Ac (1µg/ml, 10 µg/ml) y Cry1B (10 µg/ml).

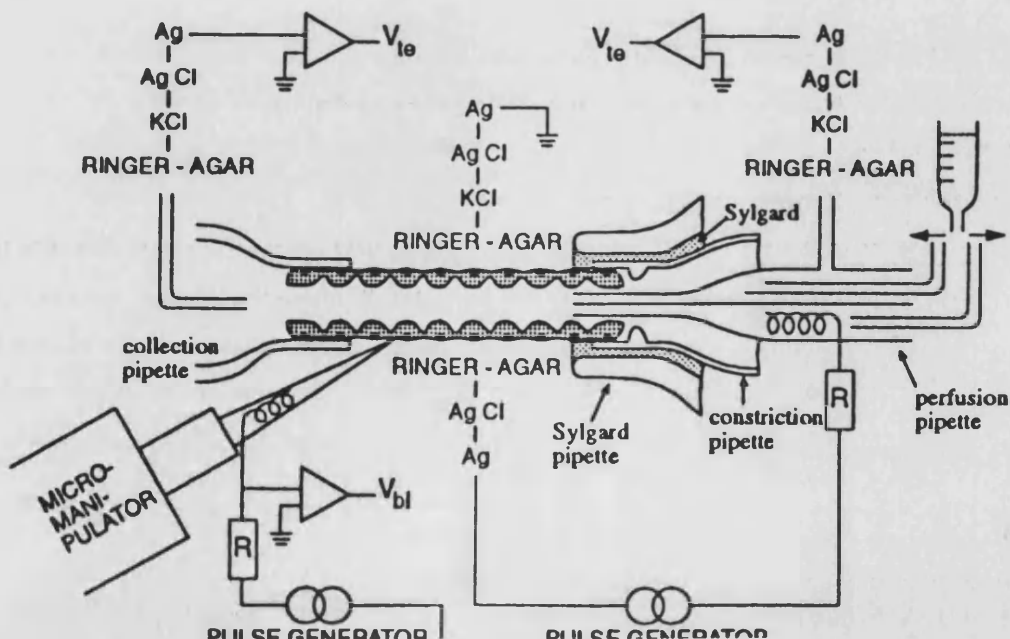
##### 15.2 Disección

Para aislar los intestinos de *Lymantria monacha*, las larvas de primer estadio tardías se colocaron en una placa con solución control. Mientras se sujetaba la larva con las pinzas de disección, la parte posterior detrás de las patas abdominales se cortó con las pinzas de disección y a continuación la larva fue decapitada. El intestino se estiraba entonces hacia fuera, cortándose la parte anterior y la parte posterior justo antes de la implantación de los túbulos de Malpighi.

### 15.3 Montaje experimental

La perfusión *in vitro* de segmentos tubulares aislados, tal y como describió Beng (1972) fue extensamente modificada por Greger y Hampel (1981) y posteriormente nuevamente modificada por Leysens *et al.* (1992) y Dijkstra *et al.* (1994). Para la perfusión luminal de intestinos de *Lymantria monacha* se utilizó el montaje puesto a punto para *Plutella xylostella* por la Dra. N. De Necker, que muy amablemente se ofreció para colaborar en este trabajo (Figura 8).

El intestino fue transferido, mediante una pipeta de vidrio, a una cámara de perfusión montada sobre la mesa de un microscopio invertido (Diaphot, Nikon, Tokyo, Japan). Al aplicar presión negativa, el extremo posterior del intestino medio fue succionado hacia dentro de una pipeta dotada de una constricción, en el extremo de perfusión. La constricción de la pipeta tenía un diámetro de alrededor de 240  $\mu\text{m}$  ensanchándose hasta alrededor de 470  $\mu\text{m}$  en la punta. La constricción de la pipeta colectora era ligeramente más ancha: alrededor de 300  $\mu\text{m}$ , para no impedir la perfusión. A continuación, la pipeta de perfusión de doble conducto se colocó en el lumen. Para asegurarse que esta pipeta estaba localizada en el lumen y para comprobar la ausencia de poros de perfusión, se aplicó presión manual a una parte de la pipeta de perfusión en el extremo de perfusión. El intestino fue entonces succionado hacia dentro de la pipeta colectora y el lumen perfundió



con la solución salina mediante presión hidrostática en la cara de perfusión, según el método descrito por Greger y Hampel (1981).

El baño era constantemente renovado mediante perfusión y una pipeta succionadora conectada a una bomba de vacío. El cambio rápido de la solución del baño fue posible conectando la pipeta de perfusión del baño a una válvula de 6 salidas. La perfusión del baño tuvo lugar por efecto de la gravedad.

#### 15.4 Medida de la diferencia de potencial transepitelial

El voltaje transtubular o transepitelial,  $V_{te}$ , fue medido en el extremo de perfusión ( $V_{te} P$ ) a través de uno de los conductos de la pipeta de perfusión vía un puente de agar (2%) KCl 100 mM con un cable Ag/AgCl, que a su vez estaba conectado a un electrómetro (Keithley 602).

### 16. Pruebas de campo

Figura 8.- Montaje experimental de la técnica de perfusión luminal.

#### 16.1 *Thaumetopoea pityocampa*

##### 16.1.1 Prueba de campo a pequeña escala

**Estado de desarrollo de la plaga:**

Tercer estadio (L3).

**Especie forestal y características:**

*Pinus sylvestris* de 2 metros de altura media.

**Protocolo utilizado:**

Antes de la aplicación, se llevó a cabo una prospección del terreno a tratar, seleccionándose 3 parcelas para los 3 bioinsecticidas a ensayar y una parcela control sin tratar, lo suficientemente separadas entre sí para evitar contaminaciones y tránsito de larvas. Se marcaron debidamente las colonias en los árboles de interés con cintas de plástico de colores para

asegurar un muestreo adecuado, y se procedió a la aplicación de los formulados a las dosis recomendadas por los fabricantes.

**Localización:**

Parcela de pinos en Bétera (Valencia).

**Formulados ensayados:**

PRODUCTO	MATERIA ACTIVA	VEHÍCULO Y DOSIS
Cordalene	Bt 7.50 BIU/L	Agua, 4.0 L/Ha
Dipel LA	Bt 16.55 BIU/L	Agua, 1.2 L/Ha
Foray 48B	Bt 12.70 BIU/L	Agua, 3.0 L/Ha

**Equipo de aplicación:**

Pulverizadora de mochila SOLO D9 425743 (SOLO Kleinmotoren GMBH). El bombeo se realizó en condiciones de presión constante durante un tiempo fijo para asegurar la uniformidad del pulverizado y su correcta dosificación.

**Diseño experimental:**

Parcelas: 4 parcelas de 500 m<sup>2</sup>.

Aplicación: 14/12/94, sobre una mayoría de orugas en L3.

Muestreo: 3 muestreos de 4 colonias cada uno, a realizar cada 7 días (21/12/94, 28/12/94, 4/01/95), tomando la oruga viva como unidad de muestreo.

**16.1.2 Prueba de campo a gran escala**

La realización de esta prueba se llevó a cabo en colaboración con el Servicio de Protección de Vegetales de la Consellería de Agricultura y Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana y bajo la supervisión técnica de D. Eduardo Obama, ingeniero técnico forestal del Servicio de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura en Madrid.

**Estado de desarrollo de la plaga:**

Para determinar el estado de desarrollo de la plaga, se registraron los estadios de 35 colonias escogidas al azar en las distintas parcelas acotadas, calculándose un 40.0% de orugas de primer estadio (L1) y un 59.5% en segundo estadio (L2).

La intensidad de ataque fue de 2250 colonias/Ha ó 1.5 por árbol, equivalente a un grado previsible de defoliación del nivel 2 (26-60%), según la actual metodología común de evaluación de daños forestales de defoliación contenida en el Anejo Técnico del Reglamento de la CEE.

**Especie forestal y características:**

Las especies atacadas fueron las variedades austríaca e hispánica de *Pinus nigra nigra Arn.* o laricio en masa de 20 años de edad, 2 m de altura media y 1500 pies/Ha. Los controles se realizaron sobre la variedad hispánica.

**Protocolo utilizado:**

El habitual para los ensayos de eficacia de *Bacillus thuringiensis* en aplicaciones aéreas de ultra bajo volumen (ULV), aprobado por el Grupo Fitosanitario de Trabajo de Forestales, Parques y Jardines, en su reunión anual celebrada en Gerona del 14 al 16 de Noviembre de 1995.

**Localización:**

La zona se localiza en el paraje denominado Comunal de los Terreros, del término de Ademuz, a unos 1200 m de altitud.

**Formulados ensayados:**

PRODUCTO	PARCELA	MATERIA ACTIVA	VEHÍCULO Y DOSIS
Testigo	T		
Consult	P1	Hexaflum. 25%	Gasoil, 5 L/Ha
Foray 48B	P3	Bt 12.7 BIU/L	Agua, 3.25 L/Ha
Foray 76B	P4	Bt 20 BIU/L	Agua, 4 L/Ha
Cordalene	P5	Bt 7.5 BIU/L	Agua, 3 L/Ha
Dipel 8L	P2	Bt 16.55 BIU/L	Agua, 2.8 L/Ha

disponibles de cada producto: Foray 48B, 30 Ha; Foray 76B, 180 Ha; Cordalene, 40 Ha; y Consult, 50 Ha. La ubicación del monte corresponde a un páramo de laderas suaves, que junto a la altura del repoblado resulta apropiado para este tipo de pruebas.

Aplicación:

El tratamiento se realizó sobre una mayoría de larvas en L2.

Las parcelas de Foray 48B (P3) y Foray 76B (P4) se trataron el 30/08/95, las de Cordalene (P5), Dipel 8L (P2) y Consult (P1) el 31/08/95, y el área de la testigo (T) se fijó el 1/09/95 (Figura 9).



Figura 9.- Disposición de las parcelas tratadas con distintas formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* para el control de la procesionaria del pino en la prueba de campo de Ademuz (Valencia).



**Muestreo:**

Siguiendo el protocolo, se programaron 4, pero la lentitud de acción de los bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* y el rápido desarrollo larvario en la testigo instaron a reducirlos a 3, de 30 colonias cada uno, a realizar en 3 tiempos (18, 41 y 60 días después del tratamiento, respectivamente) y tomando la oruga viva como unidad de muestreo.

**16.2 *Lymantria monacha***

**Prueba de campo a gran escala**

La planificación y puesta en marcha de esta prueba fue llevada a cabo con la supervisión de D. Eduardo Obama, ingeniero técnico forestal del Servicio de Sanidad del Ministerio de Agricultura en Madrid, y con la colaboración de D. Rodolfo Hernández, ingeniero técnico forestal del Laboratorio de Sanidad Vegetal de Mora de Rubielos (Teruel) y su equipo, y D. Luis Pérez, guarda forestal de Griegos (Teruel).

**Estado de desarrollo de la plaga:**

60-70% L2, cuando se inician las defoliaciones.

**Especie forestal y características:**

Las orugas en el estadio adecuado para el tratamiento fueron trasladadas desde pinares de *Pinus sylvestris* de gran altura donde está localizada la plaga a una parcela de pinos de la misma especie pero de 1.5 m de altura media, para poder realizar el tratamiento y los conteos sin problemas.

**Protocolo a utilizar:**

Antes de la aplicación, se dispusieron 4 bloques de 16 árboles cada uno, señalizados con cintas de plástico de distintos colores. De los 16 árboles de cada parcela, 3 estaban destinados para el control de las deyecciones, 12 para los controles de mortalidad de orugas y 1 previsto como suplente.

**Localización:**

Griegos (Teruel) (Figura 10).

**Equipo de aplicación:**

Pulverizador ULV manual de pilas MICROULVA.

**Diseño experimental:**

Parcelas: 4 parcelas de 16 árboles cada una.

Aplicación: Abril-Mayo 1997.

Muestreo: La evaluación de eficacia está basada en dos tipos de controles:

- Control de deposiciones

Se realiza mediante embudos de plástico duro de poliuretano de 1 mm de grosor previamente instalados en los árboles señalizados en las 4 parcelas. La recogida de excrementos se lleva a cabo durante 3 días consecutivos antes de tratar y a diario sobre 3 árboles de cada parcela, después del tratamiento.

- Control de mortalidad de orugas

Se ejecuta sólo sobre 12 árboles de cada parcela en 4 períodos: a los 2, 4, 7 y 14 días después de tratar. La toma de datos de orugas vivas se lleva a cabo mediante cuidadosas observaciones en las ramas-, ramillas, tronco y suelo de los pinos correspondientes

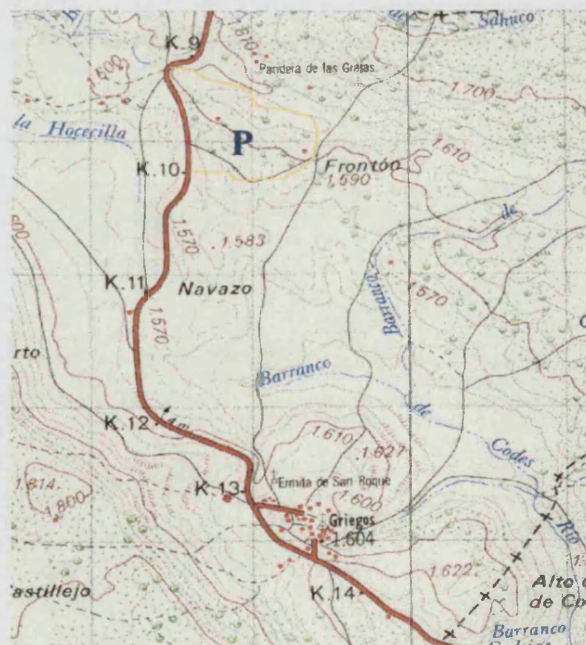


Figura 10.- Localización del área acotada (P) para la realización de la prueba de campo de Griegos (Teruel) con distintas formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* frente a *Lymantria monacha*.



## **IV RESULTADOS**

---

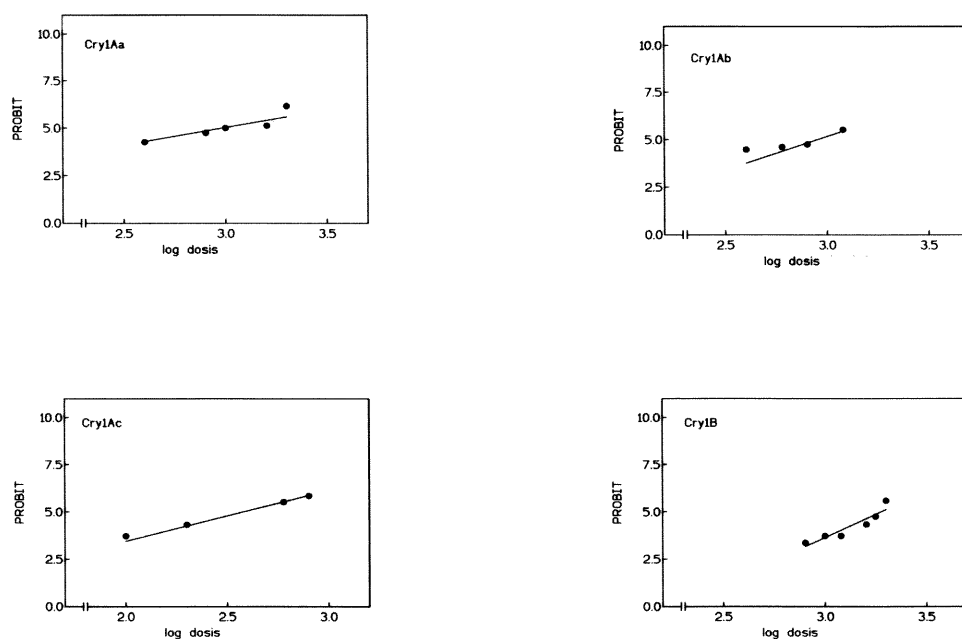


*Thaumetopoea pityocampa***1. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* frente a la plaga forestal *Thaumetopoea pityocampa* (procesionaria del pino)**

Para optimizar el uso de *Bacillus thuringiensis* en el control de la procesionaria del pino, la plaga más importante de los bosques españoles, el primer paso a abordar es la determinación de cuáles de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* causan de forma individual una mortalidad más elevada y por tanto serían más adecuadas para ser utilizadas en el campo. Nuestro estudio de toxicidad se basó en tres tipos de experiencias:

- Ensayos de toxicidad con distintas dosis de las ICPs individuales, para determinar sus LD<sub>50</sub> y LD<sub>90</sub>.
- Ensayos de intoxicación de larvas con toxinas individuales, para comparar el daño provocado a nivel intestinal por cada una de ellas.
- Ensayos de toxicidad con varios productos comerciales basados en *Bacillus thuringiensis*, para determinar también sus respectivas LD<sub>50</sub> y LD<sub>90</sub>.

Los resultados de los ensayos de toxicidad de las toxinas del tipo Cry1 de *Bacillus thuringiensis* frente a larvas de primer estadio, realizados tal y como se describe en el apartado 4 de Material y Métodos de este trabajo, se muestran en la Figura 11 y en la Tabla III.



**Figura 11.-** Curvas de mortalidad obtenidas en los ensayos de toxicidad de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B frente a larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa*. Dosis expresadas en pg/ $\mu$ l.

Tabla III.- Toxicidad de diferentes ICPs de *Bacillus thuringiensis* frente a larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa*.

Toxina	Pendiente $\pm$ SE	LD <sub>50</sub> (ng/ $\mu$ l) [FL <sub>95</sub> ]	LD <sub>90</sub> (ng/ $\mu$ l) [FL <sub>95</sub> ]
Cry1Aa	1.858 $\pm$ 0.363	0.956 [0.586-1.552]*	4.680 [2.434-35.899]*
Cry1Ab	3.554 $\pm$ 1.113	0.895 [0.694-1.687]*	2.054 [1.276-14.902]*
Cry1Ac	2.676 $\pm$ 0.549	0.379 [0.279-0.543]	1.141 [0.735-2.859]
Cry1B	16.981 $\pm$ 4.647	1.830 [1.721-1.918]	2.178 [2.040-2.635]
Cry1C	NO TOXICA		
Cry1E	NO TOXICA		

\* Límites de confianza al 90% [FL<sub>90</sub>]

De las ICPs ensayadas, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B resultaron tóxicas para *Thaumetopoea pityocampa*, mientras que Cry1C y Cry1E no mostraron ningún efecto sobre las larvas de este insecto-plaga.

Los valores de las LD<sub>50</sub> obtenidas para las toxinas del tipo Cry1A son del mismo orden (destacando ligeramente Cry1Ac como más efectiva), en tanto que Cry1B mostró un valor de LD<sub>50</sub> sensiblemente superior. Las LD<sub>90</sub> calculadas, sin embargo, indican unos valores de toxicidad similares para las Cry1A y Cry1B.

Los valores de las pendientes, por su parte, fueron también similares para las ICPs ensayadas salvo en el caso de Cry1B, que fue considerablemente superior.

En la Figura 12 se muestra el daño intestinal provocado en larvas de primer estadio por intoxicación con Cry1Ab (10 ng/ $\mu$ l), Cry1Ac (10 ng/ $\mu$ l), Cry1B (10 ng/ $\mu$ l) y Cry1Aa (1  $\mu$ g/ $\mu$ l).

Como puede observarse, el aspecto histológico de los intestinos de larvas intoxicadas frente al de los intestinos de larvas sin intoxicar es claramente diferente y manifiesta el drástico efecto de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* sobre procesionaria. Las secciones del

tejido de la región intestinal de larvas control no intoxicadas mostraron el típico tejido epitelial cilíndrico o columnar con una monocapa de células con el borde en cepillo a lo largo del margen apical, mientras que en las larvas intoxicadas el microvilli estaba totalmente fragmentado y las células lisadas invadían el lumen del intestino.

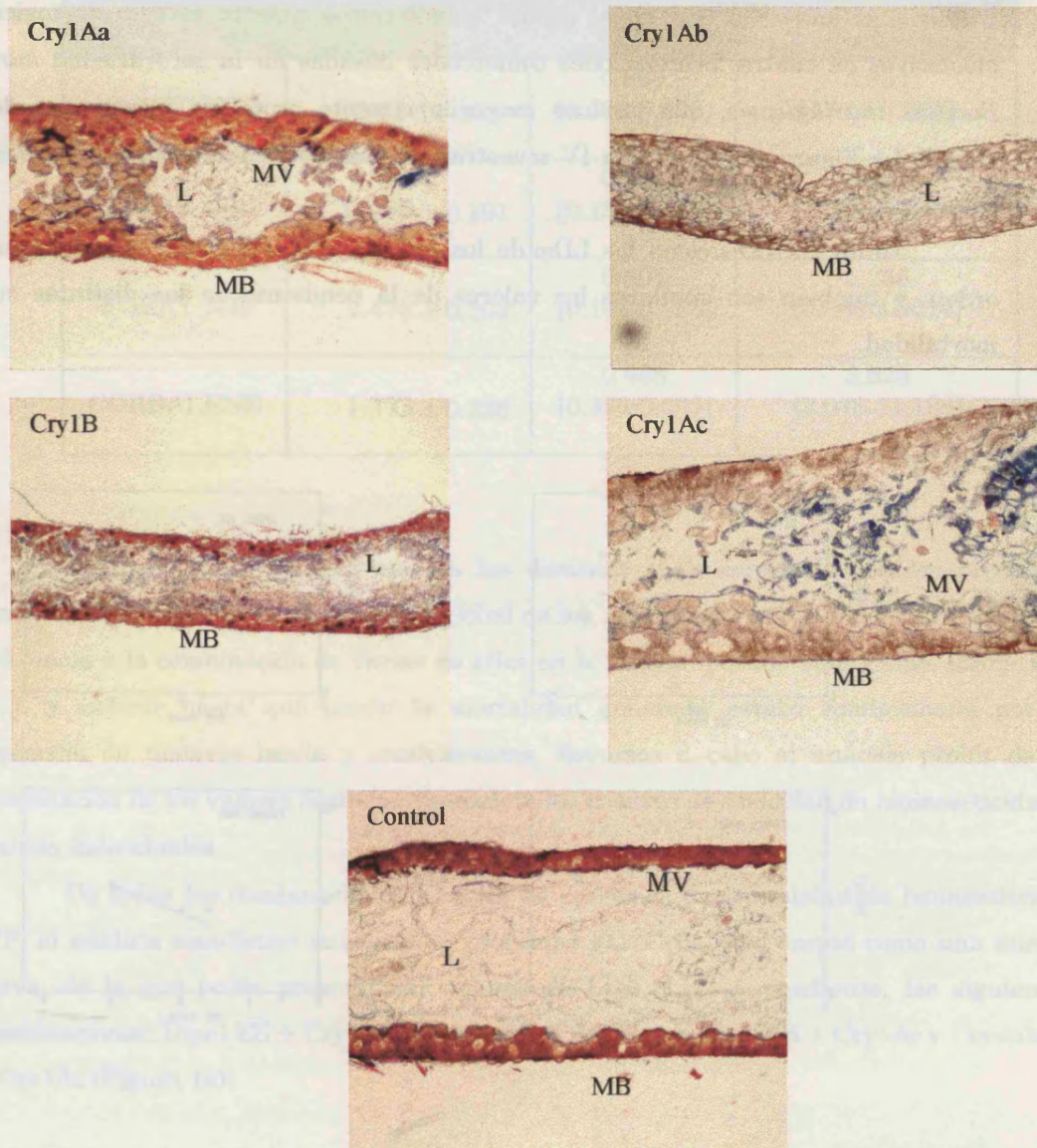


Figura 12.- Tinción citoquímica de secciones de tejido intestinal de larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa* no intoxicadas (control) e intoxicadas durante 3 h 30 min con Cry1Aa ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), Cry1Ab ( $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ ), Cry1Ac ( $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ ) y Cry1B ( $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ ). MB: membrana basal, L: lumen, MV: microvilli.



## Resultados

Los tratamientos en campo a gran escala, sin embargo, no se realizan con toxinas purificadas sino con productos comerciales, que contienen tanto material activo (ICPs de *Bacillus thuringiensis*) como material inerte (esporas, productos de fermentación) y coadyuvantes (que permiten una mejor conservación y pulverizado del formulado final).

Con vistas a intentar dar a nuestro trabajo una orientación lo más extensible posible a la situación real en el campo, completamos nuestro estudio de toxicidad con bioensayos de cuatro formulaciones comerciales basadas en la serovariedad *kurstaki* de *Bacillus thuringiensis*, que produce mayoritariamente proteínas insecticidas del grupo Cry1A. La Figura 13 y la Tabla IV muestran las curvas de mortalidad y los parámetros obtenidos.

Tanto las LD<sub>50</sub> como las LD<sub>90</sub> de los bioinsecticidas ensayados son de un mismo orden, y también son similares los valores de la pendiente de las distintas curvas de mortalidad.

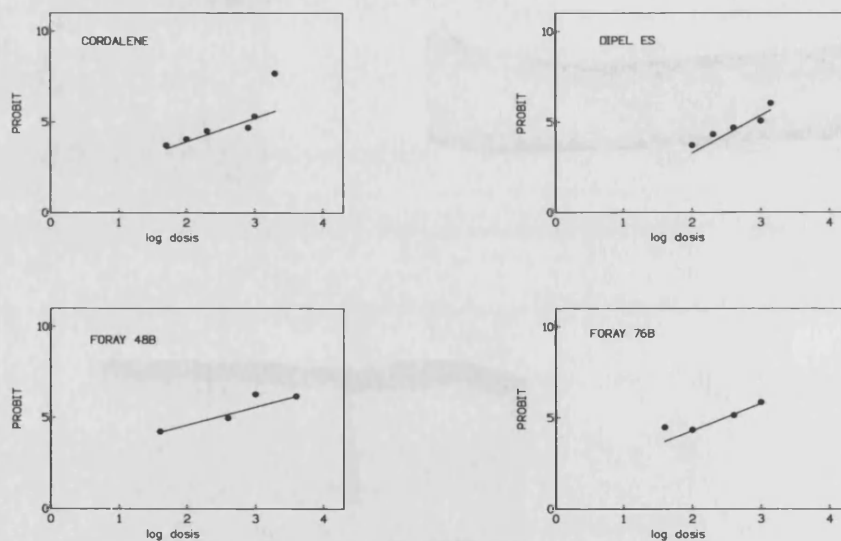


Figura 13.- Curvas de mortalidad obtenidas en los ensayos de toxicidad de Dipel, Cordalene, Foray 48B y Foray 76B frente a larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa*. Dosis expresadas en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Tabla III.- Toxicidad de diferentes formulaciones basadas en *Bacillus thuringiensis* frente a larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa*

Producto	Pendiente $\pm$ SE	LD <sub>50</sub> (ng/ $\mu$ l) [FL <sub>95</sub> ]	LD <sub>90</sub> (ng/ $\mu$ l) [FL <sub>95</sub> ]
DIPEL ES	2.62 $\pm$ 0.382	0.667 [0.502-0.978]	2.834 [1.700-7.806]
FORAY 48B	0.990 $\pm$ 0.191	0.264 [0.135-0.513]	5.294 [2.059-35.088]
FORAY 76B	1.478 $\pm$ 0.264	0.304 [0.146-0.733]	2.236 [0.868-41.014]
CORDALENE	1.373 $\pm$ 0.228	0.488 [0.369-0.697]	3.824 [2.078-11.198]

Para investigar en qué medida las distintas ICPs contenidas en los productos comerciales contribuían a la toxicidad global de los mismos, ya sea a nivel individual o en referencia a la combinación de varias de ellas en la mezcla (posible sinergismo, inhibición, etc.), y valorar hasta qué punto la mortalidad generada estaba condicionada por la presencia de materia inerte y coadyuvantes, llevamos a cabo el análisis probit de la combinación de los valores dosis-mortalidad de los ensayos de toxicidad de bioinsecticidas y toxinas individuales.

De todas las combinaciones posibles de curvas dosis-mortalidad de bioinsecticida-ICP, el análisis estadístico mediante el programa POLO-PC sólo aceptó como una misma curva, de la que podía proporcionar valores de LD<sub>50</sub>, LD<sub>90</sub> y pendiente, las siguientes combinaciones: Dipel ES + Cry1Ab, Foray 48B + Cry1Ac, Foray 76B + Cry1Ac y Cordalene + Cry1Ac (Figura 14).

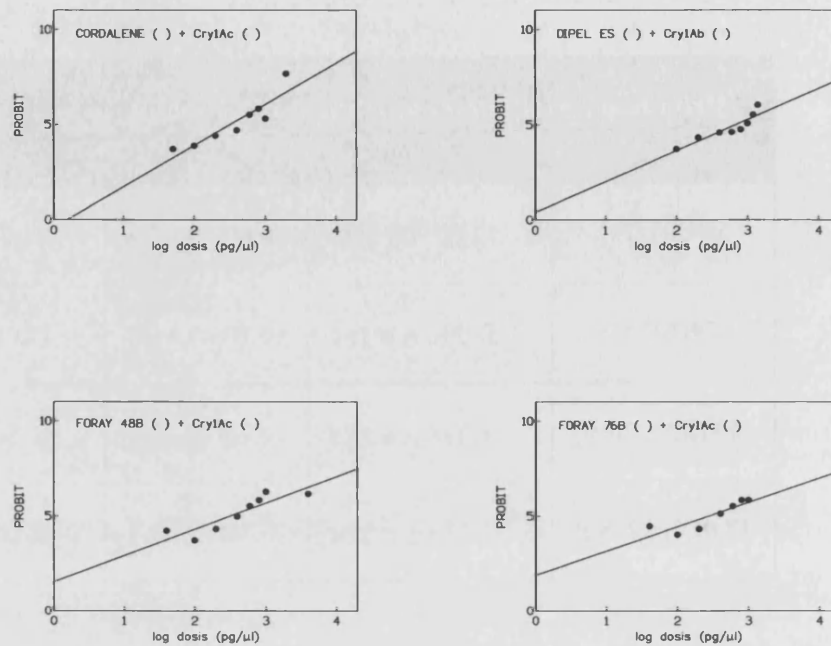


Figura 14.- Curvas de mortalidad obtenidas de las combinaciones de los valores dosis-mortalidad de los ensayos de toxicidad de bioinsecticidas y toxinas individuales: Dipel + Cry1Ab, Cordalene + Cry1Ac, Foray 48B + Cry1Ac y Foray76B + Cry1Ac. Dosis expresadas en pg/ul.

Los ensayos de toxicidad en *Thaumetopoea pityocampa*, tanto con las ICPs como con las formulaciones comerciales se realizaron en larvas de primer estadio, y la condición que aseguró la reproducibilidad de las réplicas fue que no se produjese la muda a segundo estadio durante los cuatro primeros días en que las larvas estaban expuestas al pino tratado. En los casos en que las mudas a L2 ocurrieron durante este tiempo del tratamiento, la mortalidad generada fue notablemente inferior. Para determinar si este hecho podía ser debido a una inhibición de la ingesta asociada a los fenómenos de muda larvaria circunscrito exclusivamente al momento de la muda, o se debía al hecho de una disminución en la susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis* en estadios larvarios superiores, llevamos a cabo ensayos de toxicidad en larvas de segundo y tercer estadio tardíos con Cry1Ab y Cry1Ac. Se eligieron estas dos toxinas por haber sido determinadas como las más activas frente a procesionaria y estar mayoritariamente implicadas en el efecto tóxico desarrollado por las formulaciones comerciales estudiadas.

Tal y como se muestra en la Tabla V, para unas dosis de 0.4 ng/μl de Cry1Ac y 1.0 ng/μl de Cry1Ab (dosis próximas a las LD<sub>50</sub> previamente determinadas), a medida que aumenta el estadio larvario ensayado de L1 a L3, disminuye la mortalidad generada por

ambas toxinas para una misma dosis aplicada . La disminución de la toxicidad en segundo estadio fue aparentemente mayor con Cry1Ab que con Cry1Ac, aunque un test de la t de student confirmó las diferencias observadas como no significativas. Sin embargo, una dosis diez veces mayor de ambas toxinas (10 ng/μl de Cry1Ab y 4 ng/μl de Cry1Ac) sí causó porcentajes de mortalidad significativamente diferentes (p: 0.056) en este mismo estadio.

Tabla V.- Porcentaje de mortalidad provocado por Cry1Ac (0.4 ng/μl, 4 ng/μl) y Cry1Ab (1.0 ng/μl, 10 ng/μl) en larvas de *Thaumetopoea pityocampa* de tres estadios diferentes del desarrollo: primer estadio (L1), segundo estadio (L2) y tercer estadio (L3).

TOXINA ADMINISTRADA	% MORTALIDAD ± SD		
	L1	L2	L3
Cry1Ac (0.4 ng/μl)	52.5*	35.0 ± 21.1	10.0 ± 0.0
Cry1Ac (4 ng/μl)		50.0 ± 14.1	
Cry1Ab (1.0 ng/μ)	56.8*	10.0 ± 14.1	10.0 ± 0.0
Cry1Ab (10 ng/μl)		5.0 ± 7.1	

\* Valores interpolados en las curvas dosis-mortalidad de los ensayos de toxicidad en larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa*

## 2. Mecanismo bioquímico de la toxicidad de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* frente a *Thaumetopoea pityocampa*

Una vez determinado el grado de toxicidad de distintas ICPs y preparados comerciales frente a procesionaria, el siguiente paso en nuestro estudio fue profundizar en los aspectos bioquímicos asociados a esta toxicidad. El modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* ha sido estudiado para diversos insectos plaga y parece ser que la elevada especificidad en la acción insecticida de estas toxinas frente a diversas especies de insectos radica en la existencia de sitios de unión específicos para ellas en el borde en cepillo de la membrana de su intestino medio. La unión específica toxina-receptor desencadena posteriormente toda una serie de eventos a nivel de membrana que culminan en la destrucción de las células del intestino.

Con objeto de determinar la existencia de estos sitios de unión para las ICPs de *Bacillus thuringiensis* en *Thaumentopoea pityocampa*, realizamos tres tipos de experimentos:

- Detección inmunocitoquímica de la unión *in vitro* de diferentes ICPs de *Bacillus thuringiensis* a secciones de tejido intestinal del insecto.
- Experiencias de unión de toxinas biotiniladas a vesículas de membrana del intestino de *Thaumentopoea pityocampa*.
- Experiencias de unión de toxinas marcadas radiactivamente a vesículas de membrana del intestino de la procesionaria del pino.

### **2.1 Detección inmunocitoquímica de la unión de diferentes ICPs de *Bacillus thuringiensis* a secciones del intestino del insecto**

Mediante la utilización de anticuerpos que reconocían específicamente cada una de las ICPs, detectamos su unión *in vitro* a secciones de tejido del intestino medio de procesionaria, según se describe en el apartado 8 de Material y Métodos.

En la Figura 15 se puede observar que sólo se detecta unión específica al borde en cepillo de la membrana de *T. pityocampa* para Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B, mientras que Cry1C y Cry1E no se unieron *in vitro* a la membrana intestinal. En los controles para cada toxina (reacciones en ausencia de toxina y de anticuerpo primario, respectivamente) no se observó unión en ningún caso.

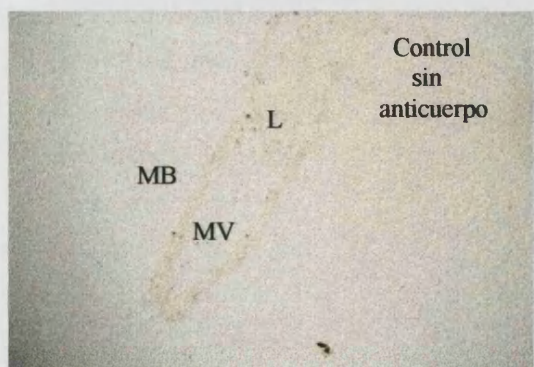
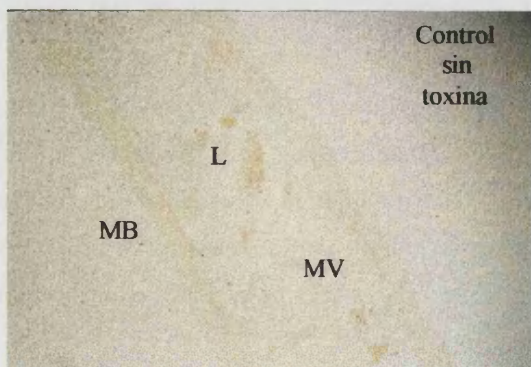
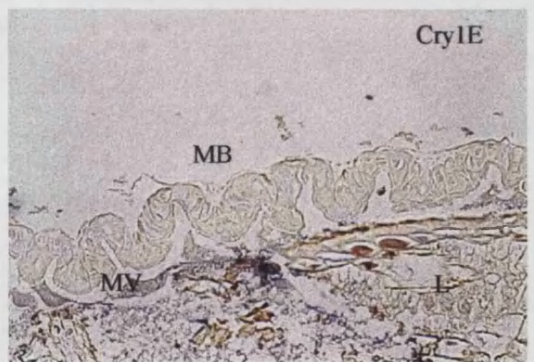
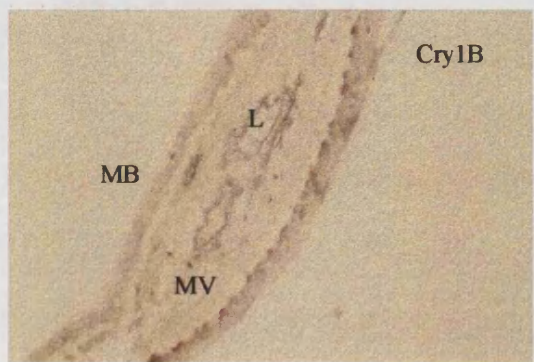
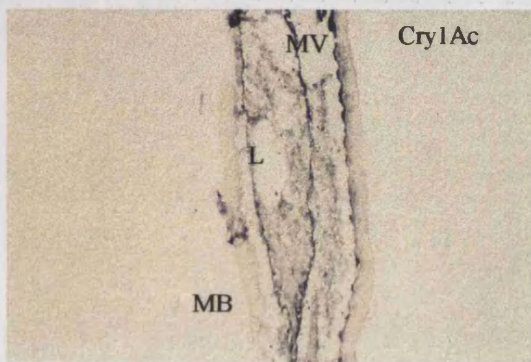
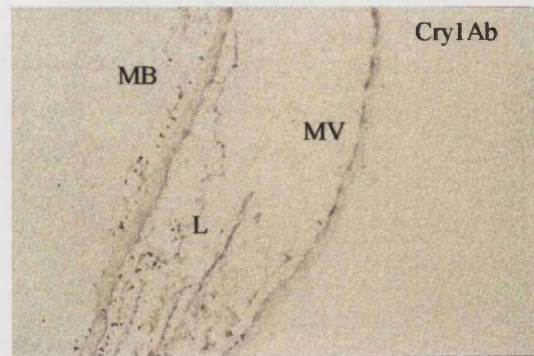
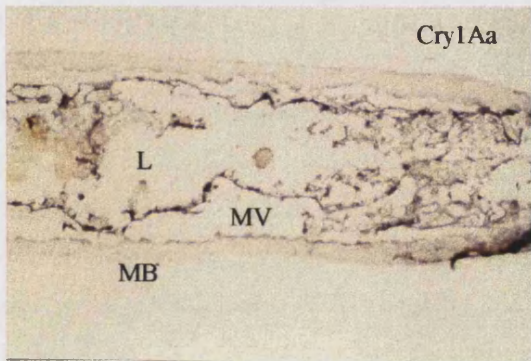


Figura 15.- Unión de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C y Cry1E a secciones de tejido intestinal de larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa*. Para cada ICP se realizaron controles en ausencia de toxina y de anticuerpo primario. MB: Membrana basal, L: Lumen, MV: microvilli.

Con la intención de detectar variaciones en la unión de Cry1Ab y Cry1Ac a lo largo del desarrollo correlacionables con las diferencias de toxicidad que habíamos determinado en los ensayos con estas toxinas en L2 tardías, llevamos a cabo la detección inmunocitoquímica de estas dos toxinas sobre secciones intestinales de larvas de *Thaumetopoea pityocampa* de tercer estadio. En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos y puede observarse que la unión de Cry1Ab al borde en cepillo de la membrana intestinal, en comparación a la unión detectada con Cry1Ac, es más débil y no se extiende de forma continua a lo largo de todo el intestino.

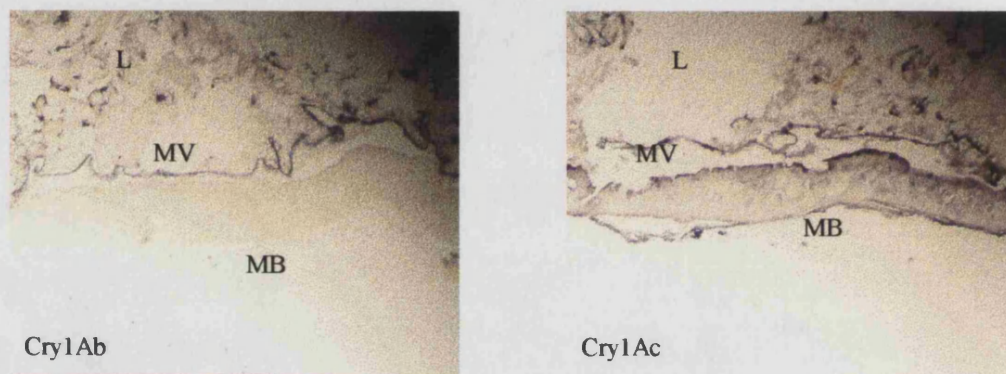


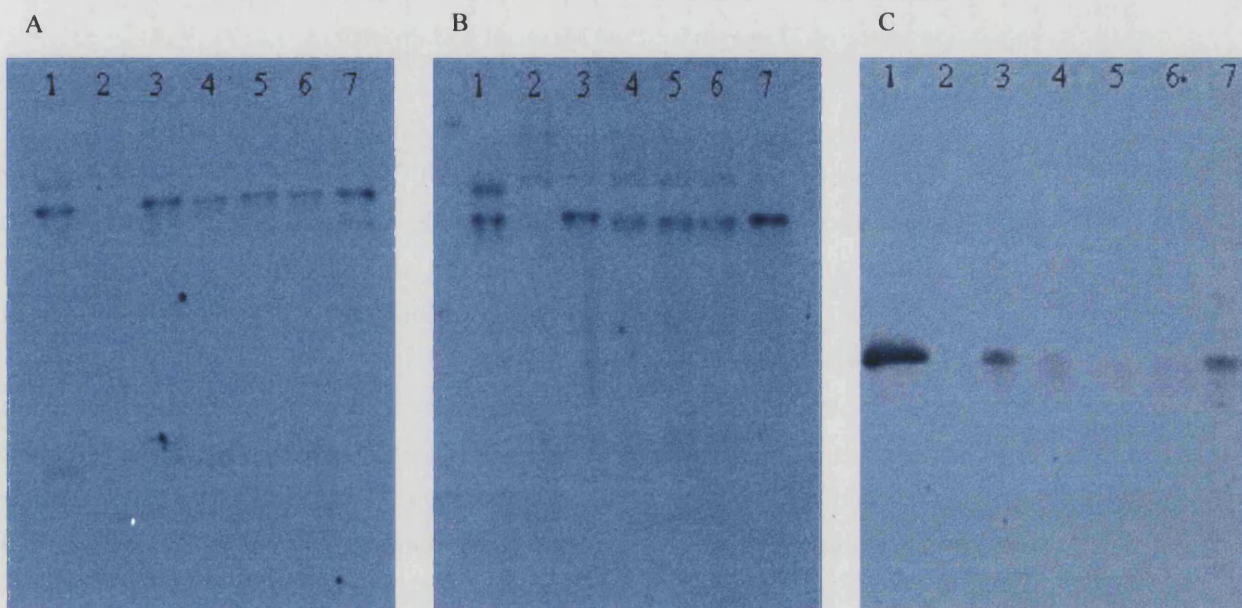
Figura 16.- Unión de Cry1Ab y Cry1Ac a secciones de tejido intestinal de larvas de tercer estadio de *Thaumetopoea pityocampa*. MB: Membrana basal, L: Lumen, MV: Microvilli

## 2.2 Experiencias de unión de toxinas biotiniladas a vesículas de membrana del intestino de *Thaumetopoea pityocampa*

Los resultados descritos en el apartado anterior nos permitieron confirmar, como ya se había demostrado en otras especies de insectos, la existencia de sitios de unión específicos para las toxinas de *Bacillus thuringiensis* en el intestino medio de la procesionaria del pino. Nos interesaba entonces, para profundizar en nuestro estudio a nivel bioquímico, poder establecer un modelo de receptores para las ICPs activas frente a esta plaga forestal.

Para ello, una vez biotiniladas las correspondientes ICPs (apartado 10 de Material y Métodos) y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 11 de Material y Métodos, realizamos experiencias de unión de toxinas biotiniladas a vesículas de membrana de larvas de *Thaumetopoea pityocampa* de primer-segundo estadio en ausencia y en presencia de competidor (toxina no biotinilada), con objeto de determinar qué toxinas comparten receptor.

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos. Utilizamos las ICPs biotiniladas Cry1Aa (Fig. 17A), Cry1Ab (Fig. 17B) y Cry1Ac (Fig. 17C) y en cada caso se realizó una competencia en presencia de exceso de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B no marcadas. En los tres casos, las toxinas del grupo Cry1A compitieron entre ellas por la unión a vesículas de membrana. Cry1B, sin embargo, no compitió por la unión de las toxinas del tipo Cry1A, en ningún caso.



**Figura 17.- Unión de ICPs biotiniladas a vesículas de membrana de larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa* con detección por quimioluminiscencia. A:** Cry1Aa biotinilada (1), vesículas de membrana de larvas enteras de primer y segundo estadio de *Thaumetopoea pityocampa* (2), vesículas de membrana incubadas con Cry1Aa biotinilada (3), vesículas de membrana incubadas con Cry1Aa biotinilada en presencia de exceso de: Cry1Aa no marcada (4), Cry1Ab no marcada (5), Cry1Ac no marcada (6) y Cry1B no marcada (7). **B:** Cry1Ab biotinilada (1), vesículas de membrana de larvas enteras de primer y segundo estadio de *Thaumetopoea pityocampa* (2), vesículas de membrana incubadas con Cry1Ab biotinilada (3), vesículas de membrana incubadas con Cry1Ab biotinilada en presencia de exceso de: Cry1Ab no marcada (4), Cry1Aa no marcada (5), Cry1Ac no marcada (6) y Cry1B no marcada (7). **C:** Cry1Ac biotinilada (1), vesículas de membrana de larvas enteras de primer y segundo estadio de *Thaumetopoea pityocampa* (2), vesículas de membrana incubadas con Cry1Ac biotinilada (3), vesículas de membrana incubadas con Cry1Ac biotinilada en presencia de exceso de: Cry1Ac no marcada (4), Cry1Aa no marcada (5), Cry1Ab no marcada (6) y Cry1B no marcada (7).

En todos los casos las bandas que aparecen tienen el peso molecular correspondiente a la toxinas marcadas (alrededor de 60 kDa)

### 2.3 Experiencias de unión de toxinas marcadas radiactivamente a vesículas de membrana del intestino de *Thaumetopoea pityocampa*

Estos experimentos de unión proteína-ligando nos permitieron completar la caracterización bioquímica del sistema de receptores mediante la determinación de los parámetros cinéticos de la unión toxina-receptor:  $K_d$  o constante de disociación aparente (inversa de la constante de asociación), que es una medida de la afinidad del receptor por el ligando, y  $R_t$  o concentración de sitios de unión.



Para analizar las diferencias a nivel de parámetros de unión entre larvas de distintos estadios, las experiencias de unión se realizaron tanto con vesículas de larvas de primer-segundo estadio como con larvas de últimos estadios.

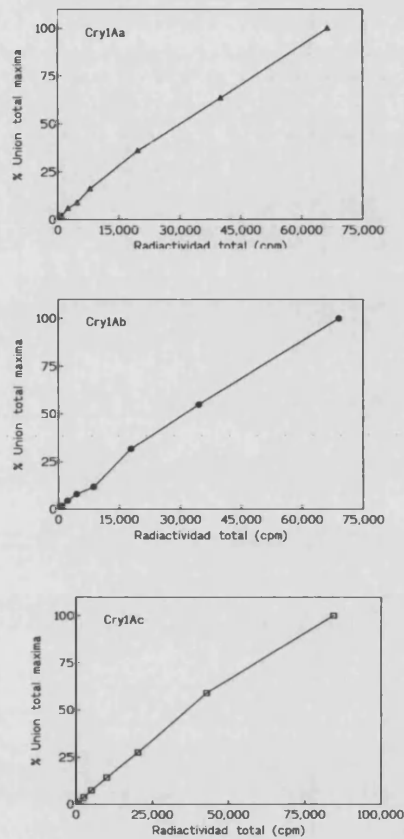
Un paso previo a la realización de estos ensayos fue la determinación de las condiciones óptimas para los mismos, es decir, la obtención de las concentraciones más adecuadas de los dos componentes de la reacción: la ICP radiactiva (el ligando) y las proteínas de vesículas (el receptor), así como el tiempo óptimo de incubación de ambas.

Las toxinas utilizadas fueron Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, y se marcaron con  $^{125}\text{I}$  tal como se describe en el apartado 12 de Material y Métodos.

### 1- Determinación de la concentración óptima de ICP radiactiva

La concentración óptima de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Aa,  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac, se determinó en los experimentos de desplazamiento. En este tipo de ensayo se mantuvo fija la cantidad de proteínas de vesículas y se varió la cantidad total de radiactividad añadida. Se determinó la unión a vesículas y se eligió la cantidad de radiactividad a utilizar en los experimentos posteriores dentro del rango lineal de unión.

Los resultados de los correspondientes experimentos de desplazamiento con las ICPs  $^{125}\text{I}$ -Cry1Aa,  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac y vesículas de larvas L1-L2 de *Thaumetopoea pityocampa* se muestran en la Figura 18. Para Cry1Ac se eligió una cantidad de radiactividad total en el ensayo de 20000 cpms, y en el caso de Cry1Aa y Cry1Ab, 40000 cpms.



**Figura 18.- Determinación de la concentración óptima de ICP radiactiva a utilizar en los ensayos de unión ICP-receptor con vesículas de membrana de larvas enteras de *Thaumetopoea pityocampa***

## 2- Determinación de la concentración óptima de proteínas de vesículas

La determinación de la cantidad óptima de proteínas de vesículas en un volumen de ensayo de 0.1 ml, se llevó a cabo mediante experimentos de saturación de vesículas. Las curvas representadas en las Figuras 19 y 20 se obtuvieron tras incubar concentraciones crecientes de proteínas de vesículas de los dos momentos del desarrollo (L1-L2 y últimos estadios, respectivamente) con la cantidad correspondiente de ICP radiactiva determinada en los experimentos de desplazamiento.

La cantidad óptima de proteínas en el volumen de ensayo utilizado se eligió dentro del rango lineal y fue de 13  $\mu\text{g}$  y 15  $\mu\text{g}$  para Cry1Aa en el caso de larvas L1-L2 y de últimos estadios, respectivamente; 4  $\mu\text{g}$  y 12  $\mu\text{g}$  para Cry1Ab en cada uno de los estadios anteriores; y 5  $\mu\text{g}$  y 18  $\mu\text{g}$  para Cry1Ac en los mismos estadios previamente citados.

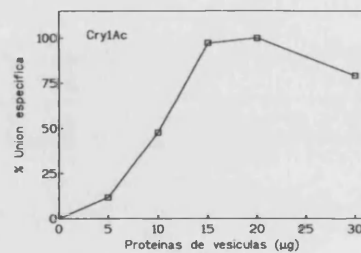
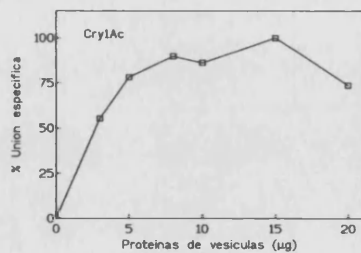
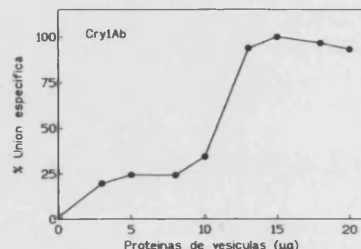
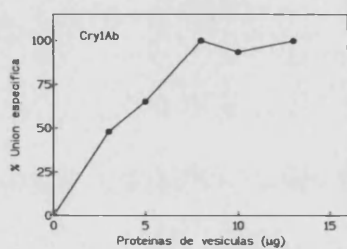
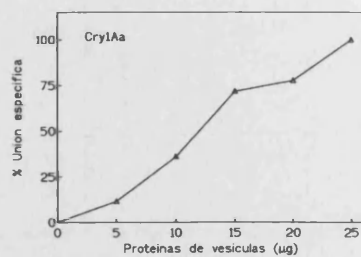
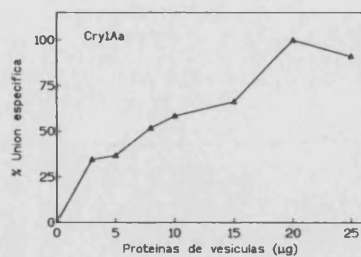


Figura 19.- Determinación de la cantidad óptima de proteínas de vesículas de larvas enteras de primer y segundo estadio de *Thaumetopoea pityocampa* para los ensayos ICP-receptor con CryIAa, CryIAb y CryIAc marcadas radiactivamente

Figura 20.- Determinación de la cantidad óptima de proteínas de vesículas de larvas enteras de últimos estadios de *Thaumetopoea pityocampa* para ensayos ICP-receptor con CryIAa, CryIAb y CryIAc marcadas radiactivamente

### 3- Determinación del tiempo de incubación

La mezcla de reacción, una vez fijados la cantidad de ICP marcada y de proteínas de vesículas, se incubó a diferentes tiempos y como se observa en las Figuras 21 y 22, los tiempos mínimos de incubación necesarios para alcanzar el equilibrio entre la concentración de proteínas de vesículas y la ICP radiactiva fueron de 1 h en todos los casos

salvo para Cry1Ab en larvas de estadios tempranos, en las que el tiempo óptimo de incubación resultó ser de 2 h.

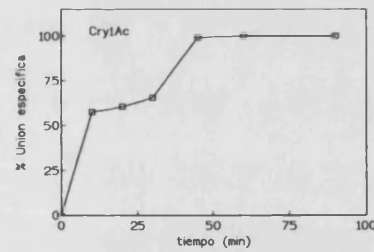
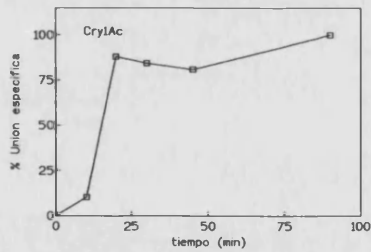
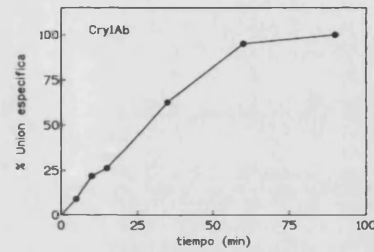
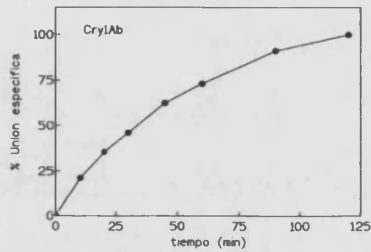
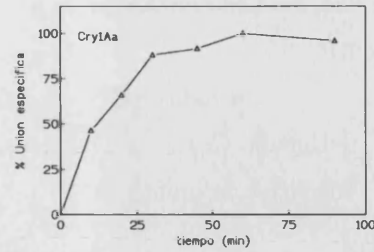
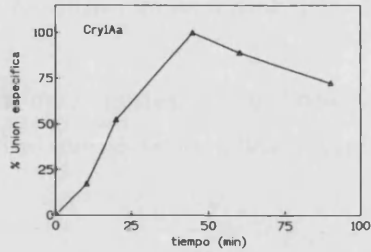


Figura 21.- Cinética de asociación de CryIAa, CryIAb y CryIAc marcadas radiactivamente a proteínas de vesículas de larvas enteras de primer y segundo estadio de *Thaumetopoea pityocampa*.

Figura 22.- Cinética de asociación de CryIAa, CryIAb y CryIAc marcadas radiactivamente a proteínas de vesículas de larvas enteras de últimos estadios de *Thaumetopoea pityocampa*.

Una vez establecidas las condiciones de ensayo para cada toxina en los dos momentos del desarrollo de procesionaria elegidos, se procedió a la obtención de la constante de disociación y la concentración de sitios de unión para estas ICPs en cada caso. Esto se realizó mediante experimentos de competencia homóloga. En los ensayos de competencia se mantiene constante la concentración de proteínas de vesículas y de ICP

## Resultados

marcada y se van añadiendo cantidades crecientes de ICP no marcada, bien la misma y en este caso se habla de experimentos de competencia homóloga, bien otra distinta, con lo que se trata de experimentos de competencia heteróloga.

Los resultados de los experimentos de competencia se muestran en las figuras 23 y 24.

En todos los casos, las competencias heterólogas muestran como todas las toxinas del grupo Cry1A son capaces, en mayor o menor medida, de desplazar la ICP marcada de sus sitios de unión.

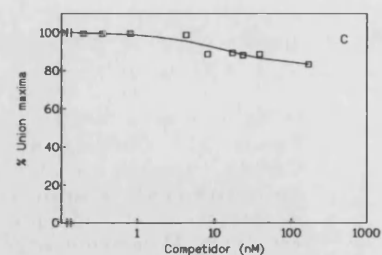
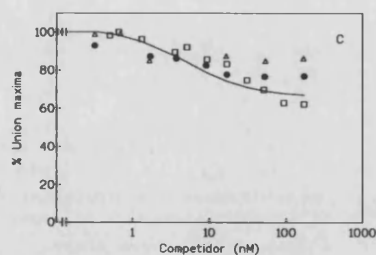
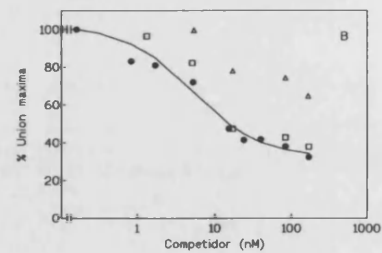
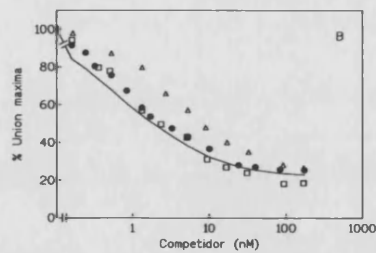
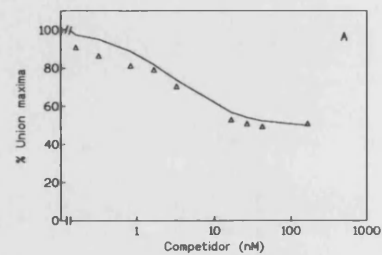
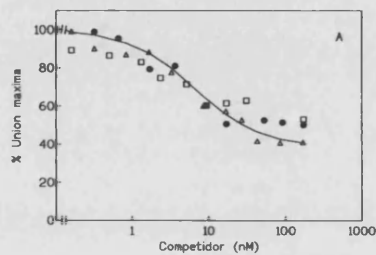


Figura 23.- Unión de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Aa (A),  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab (B) y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac (C) a proteínas de vesículas de larvas enteras de primer y segundo estadio de *Thaumetopoea pityocampa* en presencia de concentraciones crecientes de competidor no marcado: Cry1Aa ( $\Delta$ ), Cry1Ab ( $\bullet$ ) y Cry1Ac ( $\square$ ).

Figura 24.- Unión de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Aa (A),  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab (B) y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac (C) a proteínas de vesículas de larvas enteras de últimos estadios de *Thaumetopoea pityocampa* en presencia de concentraciones crecientes de competidor no marcado: Cry1Aa ( $\Delta$ ), Cry1Ab ( $\bullet$ ) y Cry1Ac ( $\square$ ).

Los resultados de las competencias homólogas fueron analizados con el programa LIGAND (Mundson y Rodbard, 1980). Este programa calcula la concentración de ligando unido como una función de la concentración total de ligando, dada una afinidad ( $K_d$ ) y la concentración total de sitios de unión ( $R_t$ ). El programa va ajustando las estimas iniciales de  $K_d$ ,  $R_t$  y la unión no específica hasta que el modelo se aproxima a los puntos experimentales tanto como sea posible. Permite también distinguir estadísticamente si el modelo se ajusta más a un único sitio de unión o a dos sitios de diferente afinidad.

Los parámetros de unión obtenidos para los distintos experimentos de competencia homóloga realizados se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI.- Parámetros obtenidos en las experiencias de unión de ICPs marcadas radiactivamente a vesículas de membrana de larvas enteras de primer y segundo estadio (L1-L2) y últimos estadios de *Thaumetopoea pityocampa*.

ICP	L1-L2		Ultimos estadios	
	$K_d \pm SD$	$R_t \pm SD$	$K_d \pm SD$	$R_t \pm SD$
Cry1Aa	$3.15 \pm 1.37$	$2.01 \pm 1.96$	$0.83 \pm 0.02$	$1.30 \pm 0.08$
Cry1Ab	① $0.29 \pm 0.17$ ② $2.55 \pm 1.62$	① $0.95 \pm 0.41$ ② $2.75 \pm 1.74$	$3.42 \pm 0.66$	$1.29 \pm 0.06$
Cry1Ac	$2.31 \pm 0.89$	$6.93 \pm 4.11$	$7.93 \pm 3.82$	$3.65 \pm 2.67$

En todos los casos, excepto en la competencia homóloga con Cry1Ab en larvas de estadios tempranos, el mejor ajuste se obtuvo para un modelo de una sola población de receptores. En los ensayos con proteínas de vesículas de larvas de primer-segundo estadio, los resultados demuestran la existencia de dos sitios de unión diferenciados para Cry1Ab.

Se aplicó un test de la t de student para determinar si las diferencias obtenidas en los dos parámetros estudiados,  $K_d$  y  $R_t$  en larvas pequeñas y grandes, eran significativas ( $p: 0.05$ ). Las diferencias entre estadios no fueron significativas para Cry1Aa y Cry1Ac, y tampoco al comparar los parámetros del segundo sitio de unión a Cry1Ab obtenidos en larvas L1-L2 con las del único sitio de unión a Cry1Ab obtenido en larvas de los últimos estadios de procesionaria. En cambio, los parámetros del primer sitio de unión a Cry1Ab en larvas pequeñas sí resultaron ser significativamente diferentes de los parámetros del sitio de unión a Cry1Ab en larvas de estadios superiores.

### 3. Evaluación de la eficacia en campo de distintas formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* frente a *Thaumetopoea pityocampa*

Con objeto de comparar la efectividad en campo de distintos productos comerciales que contienen las ICPs de *Bacillus thuringiensis* como ingrediente activo y determinar si su eficacia podía correlacionarse con su contenido en toxinas, llevamos a cabo dos pruebas de campo a grande y pequeña escala en zonas atacadas por la procesionaria del pino, en las que el estadio mayoritario de las larvas fue L1-L2 y L3-L4, respectivamente.

En la Tabla VII y la Figura 25 se muestran y representan gráficamente los porcentajes de eficacia o mortalidad obtenidos en la prueba de campo a gran escala realizada en Ademuz en colaboración con el Servicio de Protección de Vegetales de la Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana y bajo la supervisión técnica de D. Eduardo Obama. En esta prueba se utilizaron cuatro formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Dipel ES, Foray 48B, Foray 76B y Cordalene) y una formulación cuyo material activo fue un inhibidor del crecimiento (hexaflumuron), como testigo (Consult).

Tabla VII.- Número de orugas vivas y porcentajes de eficacia obtenidos para Consult (hexaflumurón), Foray 48B, Foray 76B, Dipel y Cordalene frente a un testigo sin tratar en la prueba de campo de Ademuz frente a larvas de primeros estadios de *Thaumetopoea pityocampa*. Se realizaron tres muestreos, a los 18, 41 y 60 días después de la aplicación.

Producto	Número de orugas vivas			% Eficacia		
	18 días	41 días	60 días	18 días	41 días	60 días
TESTIGO	2443	2792	2789			
CONSULT	1341	55	0	45.1	98.0	100.0
FORAY 48B	2142	1895	1725	12.3	32.1	38.1
FORAY 76B	610	593	354	75.0	78.7	87.3
CORDALENE	2435	1785	1665	0.32	36.0	40.3
DIPEL	1900	1368	1321	22.2	51.0	52.6

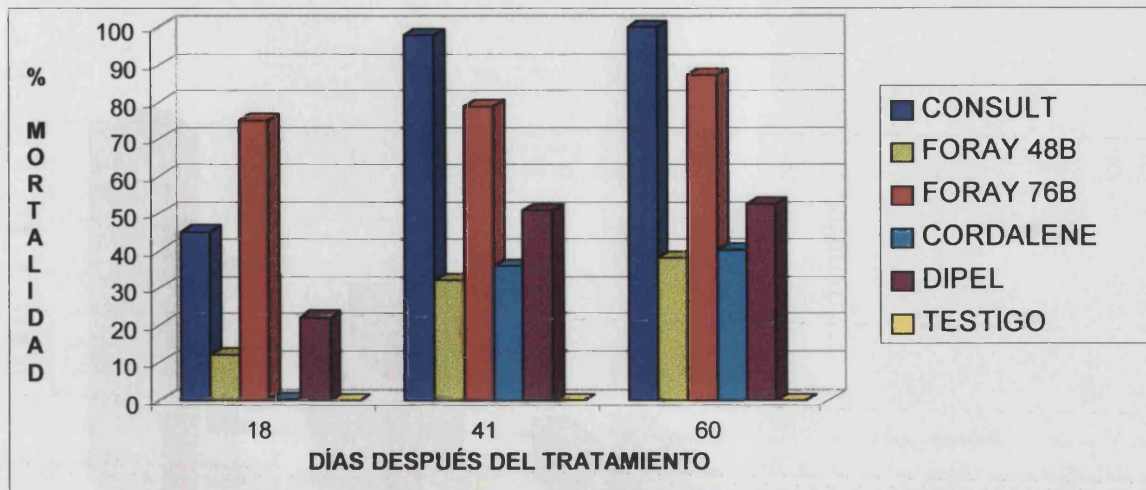


Figura 25.- Porcentaje de mortalidad obtenidos para Consult (hexaflumurón), Foray 48B, Foray 76B, Cordalene y Dipel respecto de la parcela control sin tratar en los tres muestreos realizados: 18, 41 y 60 días después del tratamiento en la prueba de campo de Ademuz frente a larvas de primeros estadios de *Thaumetopoea pityocampa*. Los porcentajes en cada caso se calcularon sobre el número de orugas vivas en la parcela testigo.

Como puede observarse, tan sólo en la parcela testigo tratada con Consult y la tratada con Foray 76B se alcanzaron en el último conteo porcentajes de eficacia aceptables para un tratamiento en campo (100% y 87.3%, respectivamente). La mortalidad conseguida por Foray 76B fue muy alta ya 18 días después del tratamiento (75%), y los conteos siguientes (41 y 60 días después del tratamiento) no registraron un incremento significativo de la eficacia. Sin embargo, los tres conteos realizados en la parcela testigo (Consult) mostraron un incremento progresivo de la mortalidad, desde el 45% del primer conteo hasta el 98% y 100% de los dos últimos.

El resto de los tratamientos, realizados con Foray 48B, Dipel ES y Cordalene, mostraron una eficacia entre el 40% y el 50% en el último conteo. Las causas de esta baja efectividad fueron probablemente las fuertes lluvias caídas sobre la zona apenas 8 h después del tratamiento el 31 de agosto (50 l/m<sup>2</sup>) y el 1 de septiembre (10 l/m<sup>2</sup>).

En la Figura 26 aparecen los porcentajes de eficacia obtenidos en la prueba de campo a pequeña escala realizada en Bétera. En esta prueba se utilizaron 3 formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* (Dipel ES, Foray 48B y Cordalene).



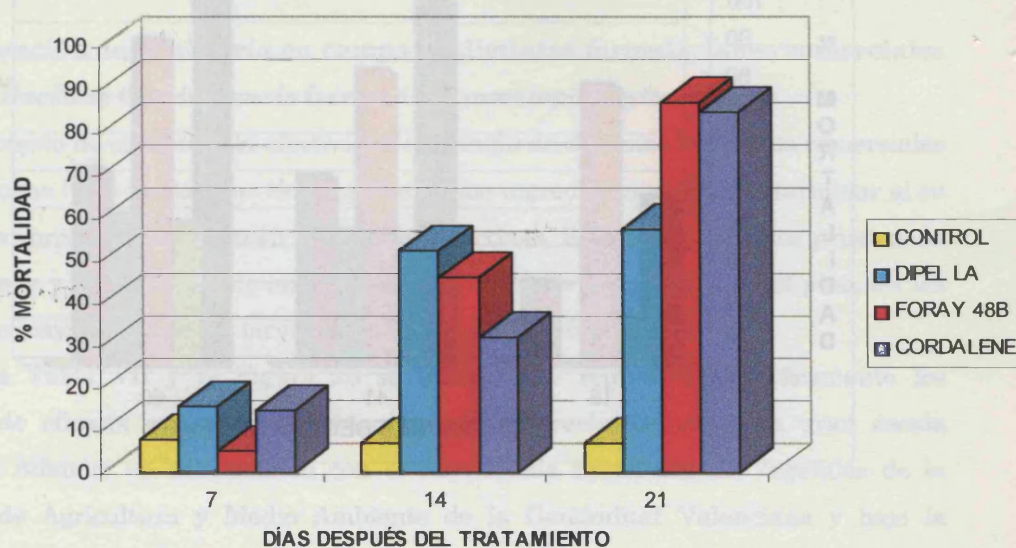


Figura 26.- Porcentajes de mortalidad obtenidas para Foray 48B, Dipel, Cordalene y la parcela control sin tratar en los tres muestreos realizados: 7, 14 y 21 días después del tratamiento en la prueba de campo de Bétera frente a larvas de tercer y cuarto estadio de *Thaumetopoea pityocampa*. Los porcentajes de orugas muertas se calcularon sobre el total de orugas (vivas y muertas) en cada caso. El porcentaje de mortalidad de la parcela control (no tratada) en todos los muestreos fue de alrededor del 7%.

La realización de esta prueba se llevó a cabo en unas inmejorables condiciones climatológicas (ausencia de lluvia y temperaturas muy suaves), por lo que los resultados obtenidos no se vieron afectados por este imponderable.

La evolución de la mortalidad causada por las tres formulaciones comerciales siguió una pauta de incremento similar del primer al segundo conteo. Sin embargo, en el tercer conteo, sólo registramos un incremento apreciable de la mortalidad en las colonias tratadas con Foray 48B y Cordalene. Los porcentajes de mortalidad obtenidos en este último conteo fueron del mismo orden para Foray 48B y Cordalene (86.6% y 84.2%, respectivamente), mientras que la eficacia de Dipel resultó ser de tan sólo 57%. En todos los conteos, la mortalidad del control fue constante, alrededor del 7%.

De igual manera, en el último muestreo realizado, el estadio de las larvas control y de las colonias tratadas con Dipel fue sensiblemente mayor (cuarto estadio mayoritariamente) que el de las larvas tratadas con Foray 48B y Cordalene.

## *Lymantria monacha*

### 1. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* frente a la plaga forestal *Lymantria monacha*

Con objeto de determinar cuáles de las ICPs disponibles son más activas frente a este insecto y poder optimizar así la utilización de *Bacillus thuringiensis* para su control en campo, realizamos un estudio de toxicidad basado en cuatro tipos de experiencias distintas:

- Ensayos de toxicidad con dos productos comerciales basados en *Bacillus thuringiensis*, para determinar sus respectivas LD<sub>50</sub> y LD<sub>90</sub>.
- Ensayos de toxicidad con las ICPs del grupo Cry1A, para determinar su efecto a nivel de retraso en el desarrollo de las larvas tratadas.
- Ensayos de intoxicación con estas mismas toxinas para comparar el daño intestinal provocado por cada una de ellas.
- Experiencias de perfusión luminal y medida del voltaje transepitelial generado por varias ICPs, para estudiar su capacidad para formar canales iónicos en la membrana intestinal de *Lymantria monacha*.

En la Figura 27 se muestra la curva dosis-mortalidad obtenida a partir de los ensayos de toxicidad realizados en larvas de tercer estadio recién mudadas de la población alemana, a las que se forzó a ingerir diferentes dosis del bioinsecticida Dipel.

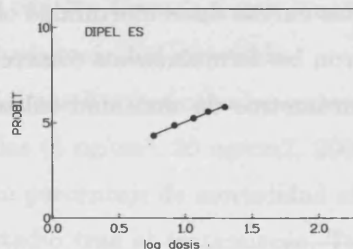


Figura 27.- Curva de mortalidad obtenida en el ensayo de toxicidad de ingestión forzada de Dipel frente a larvas de tercer estadio recién mudadas de la población alemana de *Lymantria monacha*. Dosis expresadas en IU/larva.

Los parámetros de toxicidad calculados en este caso fueron los siguientes:

Pendiente:  $4.266 \pm 0.790$

LD<sub>50</sub> [FL<sub>95</sub>]: 7.597 [6.143-8.747] (IU/larva)

LD<sub>90</sub> [FL<sub>95</sub>]: 15.171 [12.779-20.689] (IU/larva)

Estos bioensayos fueron realizados durante una estancia corta de investigación en el Departamento de Zoología Aplicada de la Facultad de Ciencias Forestales de la Ludwig-Maximilians-Universität München (Alemania), dedicada al aprendizaje del mantenimiento y manejo en el laboratorio de la plaga forestal *Lymantria monacha*, y la puesta a punto de los ensayos de toxicidad con *Bacillus thuringiensis*, bajo la supervisión del Dr. Axel Gruppe y la Dra. Gema Pérez-Guerra.

Larvas de tercer estadio recién mudadas de la población de *Lymantria monacha* de Orihuela del Tremedal (Teruel) fueron forzadas a ingerir la dosis de Dipel determinada como LD<sub>50</sub> para la población alemana y el porcentaje de mortalidad obtenida para esta dosis en la población española fue del 80.0 ± 0.0 % (considerablemente superior al 50% de la población alemana).

El método de la ingestión forzada llevado a cabo en los ensayos de toxicidad en estos insectos, aunque muy fiable en cuanto a la cuantificación de la dosis ingerida por cada insecto en las diferentes réplicas, resultó poco práctico por la imposibilidad de realizar un número adecuado de bioensayos a la vez (conseguir que una larva ingiera la dosis adecuada es un proceso lento y por tanto excesivamente tedioso si se han de ensayar varios preparados con distintas dosis y varias réplicas de cada una de ellas).

Por ello, los ensayos de toxicidad con la población española de *Lymantria monacha* se realizaron con larvas de segundo estadio recién mudadas, incorporando las distintas dosis a ensayar a la dieta artificial con la que estos insectos eran mantenidos en el laboratorio.

La Figura 28 muestra las curvas dosis-mortalidad obtenidas con larvas procedentes de Orihuela cuando se ensayaron las formulaciones comerciales Foray 48B y Dipel ES. En la Tabla VIII aparecen los parámetros de toxicidad calculados a partir de estas curvas dosis-mortalidad.

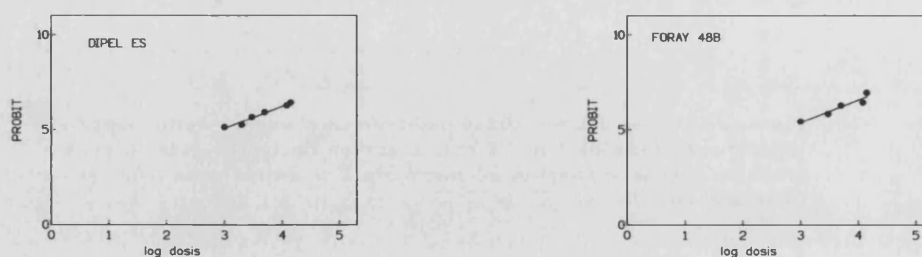


Figura 28.- Curvas de mortalidad obtenidas en los ensayos de toxicidad en dieta artificial de Dipel ES y Foray 48B frente a larvas de segundo estadio recién mudadas de la población española de *Lymantria monacha*. Dosis expresadas en ng/cm<sup>2</sup>.

Tabla VIII.- Toxicidad de Dipel ES y Foray 48B frente a larvas de segundo estadio recién mudadas de la población española de *Lymantria monacha*.

Producto	Pendiente $\pm$ SE	LD <sub>50</sub> $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [FL <sub>95</sub> ]	LD <sub>90</sub> $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [FL <sub>95</sub> ]
DIPEL ES	1.21 $\pm$ 0.27	0.950 [0.297-1.598]	10.834 [6.878-28.216]
FORAY 48B	1.16 $\pm$ 0.35	0.478 [0.017-1.199]	6.067 [3.629-14.336]

Las pendientes de las curvas de ambos productos resultaron muy similares, pero las LD<sub>50</sub> y LD<sub>90</sub> de Foray 48B fueron inferiores, indicando una mayor toxicidad de este formulado comercial frente a Dipel ES.

Los valores de LD<sub>50</sub> y LD<sub>90</sub> obtenidos para ambas formulaciones fueron, sin embargo, muy altos. En *Thaumetopoea pityocampa* vimos que la toxicidad de los preparados comerciales viene determinada por la toxina en la que éstos están enriquecidos, la realización de ensayos de toxicidad de ICPs purificadas en *Lymantria monacha* se hizo impracticable, pues las cantidades de toxina necesaria para realizar bioensayos similares a los ensayos de toxicidad con las formulaciones comerciales excedían los límites de lo que supone una correlación dosis-toxicidad aceptable.

Por lo tanto, decidimos llevar a cabo los ensayos de toxicidad de las ICPs del grupo Cry1A con dosis subletales (2 ng/cm<sup>2</sup>, 20 ng/cm<sup>2</sup>, 200 ng/cm<sup>2</sup>) y evaluar su efecto sobre el insecto no en términos de porcentaje de mortalidad sino en porcentaje de larvas vivas que no mudaban a tercer estadio tras el tratamiento. Tanto en las larvas tratadas como las larvas sin tratar, el porcentaje de mortalidad no excedió del 5%, y en el caso de estas últimas, que constituyen el control de la experiencia (larvas no sometidas a tratamiento), alrededor del 87% mudaron a tercer estadio.

Los resultados obtenidos (Figura 29) indican que las tres toxinas del tipo Cry1A afectan al desarrollo de las larvas de *Lymantria monacha*, llegando a inhibir la muda prácticamente en el 100 % de las larvas tratadas con una dosis de 200 ng/cm<sup>2</sup>, frente al control de larvas sin tratar, en el que tan sólo alrededor de un 13% de las larvas no mudó a tercer estadio. Sin embargo, para una dosis de 2 ng/cm<sup>2</sup> tan sólo Cry1Aa provocó una inhibición de la muda de aproximadamente 50%. Cry1Ac inhibió la muda alrededor de un 50% cuando se trató las larvas con una dosis de 20 ng/cm<sup>2</sup>, mientras que Cry1Ab

## Resultados

necesitaria de dosis aún mayores para alcanzar este porcentaje de inhibición de la muda. Por tanto, el orden de efectividad en la inhibición de la muda fue el siguiente: Cry1Aa > Cry1Ac > Cry1Ab.

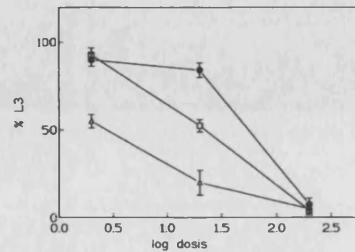


Figura 29.- Porcentaje de larvas de *Lymantria monacha* de segundo estadio (L2) que mudan a tercer estadio (L3) tras los ensayos de toxicidad en dieta artificial con dosis subletales de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. Los porcentajes se han calculado respecto al total de larvas vivas tras los bioensayos. En el control sin tratar, el porcentaje de larvas de *Lymantria monacha* que mudó a L3 fue del 87%. Dosis expresadas en ng/cm<sup>2</sup>.

Para evaluar el efecto histopatológico de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* en el intestino de *Lymantria monacha*, se intoxicaron larvas recién mudadas a tercer estadio forzándolas a la ingestión de una dosis de 1.6 ng de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B. La Figura 30 muestra el aspecto del intestino del insecto tras la intoxicación con estas cuatro toxinas frente al intestino control de una larva sin intoxicar. Como puede apreciarse en la figura, no se observó daño alguno en los intestinos de larvas tratadas con Cry1Ab y Cry1B, mientras que en los tratados con Cry1Aa los signos de vacuolación, de hinchamiento y ruptura celular empezaban a hacerse patentes, y en los tratados con Cry1Ac la destrucción del intestino es dramática, con las células lisadas invadiendo ya el lumen del intestino. El orden de efectividad pues, atendiendo al efecto citotóxico causado fue el siguiente: Cry1Ac > Cry1Aa > Cry1Ab = Cry1B.

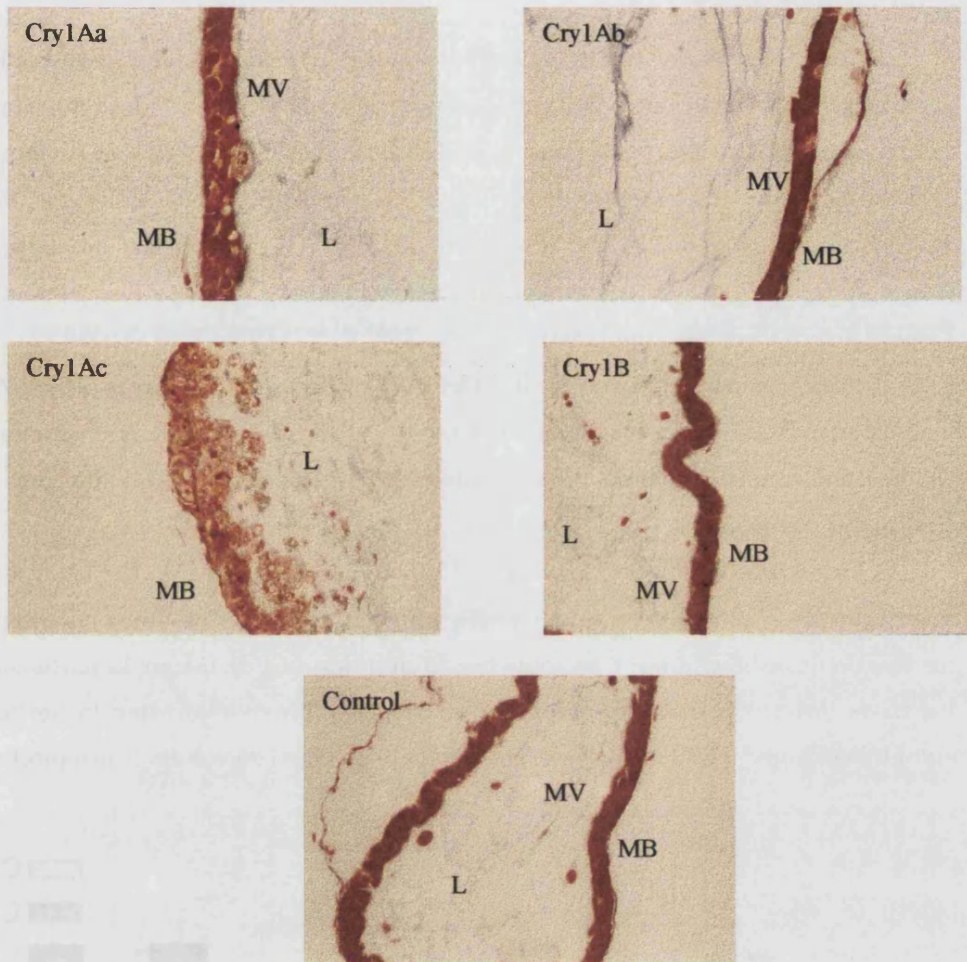


Figura 30.- Tinción citoquímica de secciones de tejido intestinal de larvas de tercer estadio recién mudadas de *Lymantria monacha* no intoxicadas (control) e intoxicadas mediante la ingestión forzada de 1.6 ng de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B. MB: membrana basal, L: lumen, MV: microvilli

La causa de la vacuolación y destrucción de las células del intestino medio de insectos que han ingerido toxinas de *Bacillus thuringiensis* parece ser la formación de poros en la membrana intestinal de los mismos tras la unión de las ICPs a receptores específicos de la membrana de los insectos susceptibles. El hecho de que Cry1Ab provoque una inhibición de la muda en *Lymantria monacha* de segundo estadio en un rango de dosis similar a Cry1Aa y Cry1Ac, pero no provoque daño a nivel histológico en larvas de tercer estadio para una dosis (1.6 ng) con la que las otras dos toxinas de tipo Cry1A sí tienen un claro efecto citotóxico, podría estar indicando un modo de acción diferente de Cry1Ab

respecto al de las ICPs estudiadas, precisamente a nivel de formación de poros en la membrana del intestino del insecto.

Con objeto de investigar la capacidad de Cry1Ab para inducir la formación de poros en la membrana intestinal y crear el desequilibrio osmótico que conduce a la ruptura de las células, en colaboración con la Dra. N. De Necker, de la Universidad de Limburg (Bélgica), se llevaron a cabo experimentos de perfusión luminal de intestinos, en los que, tal y como se detalla en el apartado 15 de la sección de Material y Métodos, se midió el voltaje transepitelial (Vte) tras la perfusión forzada de toxinas a través del intestino medio de *Lymantria monacha* de primer estadio.

Para comparar el efecto de Cry1Ab respecto al de otras ICPs de *Bacillus thuringiensis* se eligieron las toxinas Cry1Ac y Cry1B, determinadas como las más activa y la de menor efecto tóxico, respectivamente, en las experiencias de intoxicación de *Lymantria monacha*.

La Figura 31 muestra los resultados obtenidos con Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B frente a un control en el que sólo se perfundió solución tampón. Los datos corresponden a las medias de 6 medidas diferentes tomadas 25 min después de iniciar la perfusión. En todos los casos, los valores de Vte obtenidos en el momento de realizarse la perfusión fueron similares ( $62.58 \pm 24.93$  mV), constituyendo la línea basal de voltaje transepitelial.

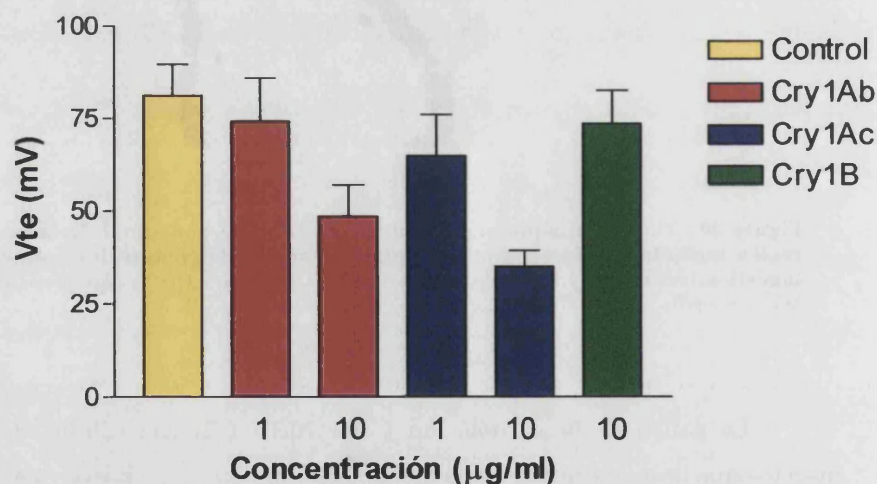


Figura 31.- Voltaje transepitelial medido 25 min después de la perfusión forzada de solución tampón, Cry1Ab (1 µg/ml y 10 µg/ml), Cry1Ac (1 µg/ml y 10 µg/ml) y Cry1B (10 µg/ml) a intestinos disecados de larvas de primer estadio de *Lymantria monacha*. Los porcentajes se han calculado respecto del voltaje transepitelial 1 min después de iniciar la perfusión forzada en cada caso.

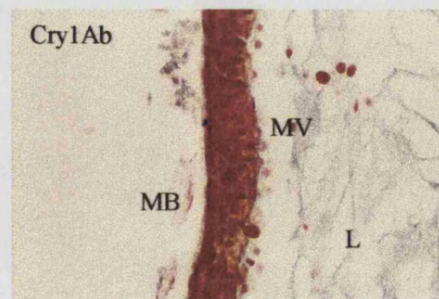
Realizamos un test de ANOVA de dos vías con los datos de Vte obtenidos al perfundir Cry1Ab y Cry1Ac (variable: tratamiento) a dos concentraciones distintas: 1 µg/ml y 10 µg/ml (variable: concentración), y aunque la interacción entre las dos variables

analizadas (tratamiento y concentración) no resultó significativa, sí lo fueron las diferencias entre tratamientos ( $p$ : 0.0144) y, dentro de cada tratamiento, las diferencias entre concentraciones ( $p$ : 0.0277).

Un test de ANOVA de una vía aplicado para los datos de Vte del control, Cry1Ab y Cry1Ac a concentración 1  $\mu\text{g/ml}$  frente al control descartó que se tratara de valores diferentes ( $p > 0.05$ ).

No obstante, un test de ANOVA de una vía realizado sobre los datos de Vte del control, Cry1Ab (10  $\mu\text{g/ml}$ ), Cry1Ac (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y Cry1B (10  $\mu\text{g/ml}$ ), determinó la existencia de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en las medias de de los tratamientos empleados. Para establecer qué ICPs en concreto generaron un Vte significativamente distinto del Vte medido para el control, se realizó un test de comparación múltiple de Dunnet con el que pudimos concluir que para la dosis más alta utilizada (10  $\mu\text{g/ml}$ ) sólo los valores obtenidos al perfundir Cry1Ab y Cry1Ac fueron significativamente distintos del Vte generado por la solución tampón ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente). El Vte creado por Cry1B, sin embargo, no mostró diferencias significativas respecto del control ( $p > 0.05$ ). Cuando realizamos un test de comparación múltiple de Dunnet para contrastar los valores de Vte obtenidos con Cry1Ab (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y Cry1Ac (10  $\mu\text{g/ml}$ ), las diferencias observadas no resultaron significativas ( $p > 0.05$ ).

La capacidad de Cry1Ab para formar poros en la membrana intestinal en condiciones *in vitro* nos sugirió que la ausencia de efecto citotóxico detectada tras la intoxicación de larvas de tercer estadio de *Lymantria monacha* podía ser debida simplemente a que la dosis ingerida no fue lo suficientemente alta para observar daño a nivel intestinal durante el tiempo de intoxicación del ensayo. Para confirmar esta hipótesis, larvas de tercer estadio recién mudadas fueron intoxicadas con una dosis de 1.6  $\mu\text{g}$  de Cry1Ab (mil veces superior a la utilizada anteriormente), detectándose entonces sí los signos propios de destrucción de la membrana intestinal causados por las ICPs de *Bacillus thuringiensis* (Figura 32).



**Figura 32.-** Tinción citoquímica de secciones de tejido intestinal de larvas de tercer estadio recién mudadas de *Lymantria monacha* intoxicadas mediante la ingestión forzada de 1.6  $\mu\text{g}$  de Cry1Ab.

MB: membrana basal, L: lumen, MV: microvilli.



## 2. Mecanismo bioquímico de la toxicidad de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* frente a *Lymantria monacha*

Con objeto de determinar la existencia de sitios de unión específicos para las ICPs de *Bacillus thuringiensis* en el insecto-plaga *Lymantria monacha*, y poder establecer un modelo de receptores, llevamos a cabo dos tipos de experiencias:

- Detección inmunocitoquímica de la unión de diferentes ICPs de *Bacillus thuringiensis* a secciones de tejido intestinal del insecto
- Experiencias de unión de toxinas marcadas radiactivamente a vesículas de membrana del intestino de *Lymantria monacha*

### 2.1 Detección inmunocitoquímica de la unión *in vitro* de diferentes ICPs de *Bacillus thuringiensis* a secciones de tejido intestinal de *Lymantria monacha*

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 8 de Material y Métodos, mediante la utilización de anticuerpos fue posible observar la unión de las toxinas a la membrana de borde en cepillo del epitelio intestinal de *Lymantria monacha*, tal como puede verse en la Figura 33.

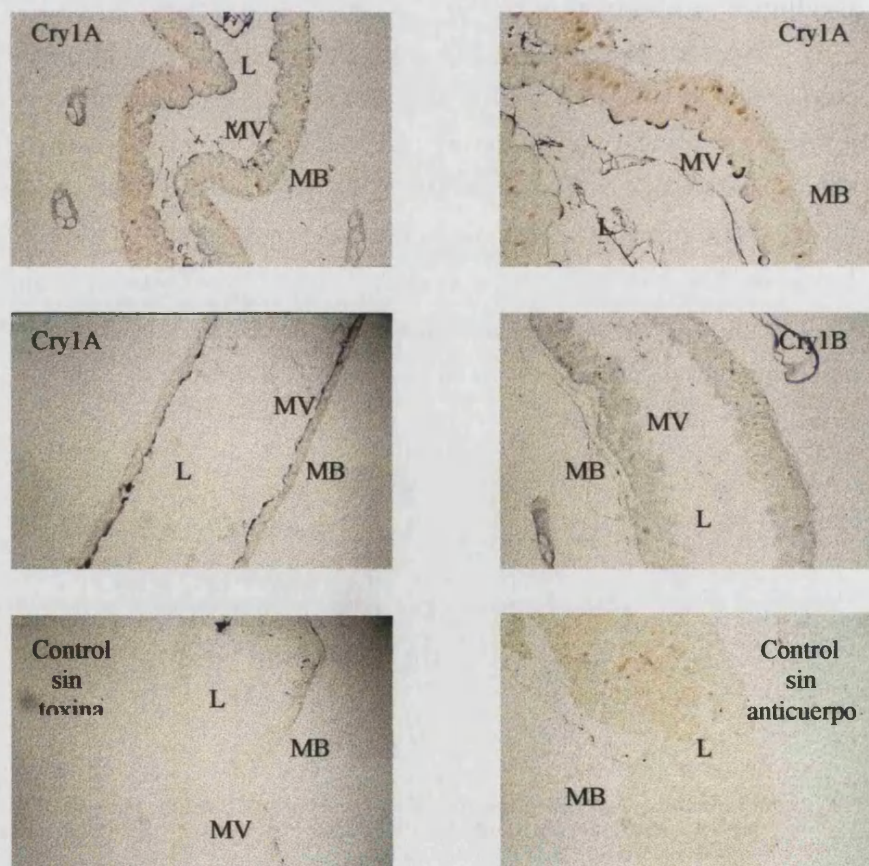


Figura 33.- Unión de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B a secciones de tejido intestinal de larvas de segundo estadio de *Lymantria monacha*. Para cada ICP se realizaron controles en ausencia de toxina y de anticuerpo primario. MB: membrana basal, L: lumen, MV: microvilli

Se detectó unión específica a la membrana intestinal para Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, y ausencia de unión cuando las secciones histológicas se incubaron con Cry1B. Tampoco se detectó unión específica en ninguno de los controles efectuados en ausencia de toxina y de anticuerpo primario.

## 2.2 Experiencias de unión de toxinas marcadas radiactivamente a vesículas de membrana del intestino de *Lymantria monacha*

Previamente a la realización de competencias homólogas y heterólogas para la caracterización del sistema de receptores de las toxinas del tipo Cry1A, se establecieron las condiciones de ensayo para estos experimentos de unión  $^{125}\text{I}$ -ICP-receptor, en BBMVs de larvas de últimos estadios.

### 1- Determinación de la concentración de ICP radiactiva

La concentración óptima de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Aa,  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac se determinó en los experimentos de desplazamiento (Figura 34). La concentración de cada ICP se escogió dentro del tramo lineal y fue de 40000 cpms para Cry1Aa y Cry1Ab, y de 2000 cpms para Cry1Ac.

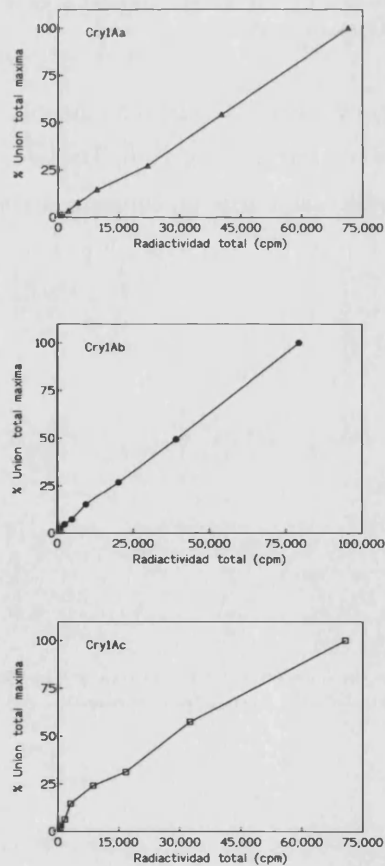


Figura 34.- Determinación de la concentración óptima de ICP radiactiva a utilizar en los ensayos de unión ICP-receptor con vesículas de membrana de intestinos de larvas de últimos estadios de *Lymantria monacha*.

## Resultados

### 2- Determinación de la concentración óptima de proteínas de vesículas

La determinación de la cantidad óptima de proteínas de vesículas en un volumen de ensayo de 0.1 ml se llevó a cabo mediante experimentos de saturación de vesículas (Figura 35).

La cantidad de proteínas de vesículas en el volumen de ensayo utilizado se eligió dentro del rango lineal y fue de 15  $\mu\text{g}$  para Cry1Aa y de 12  $\mu\text{g}$  para Cry1Ac. En las condiciones de ensayo no fue posible detectar unión específica de Cry1Ab a proteínas de vesículas.

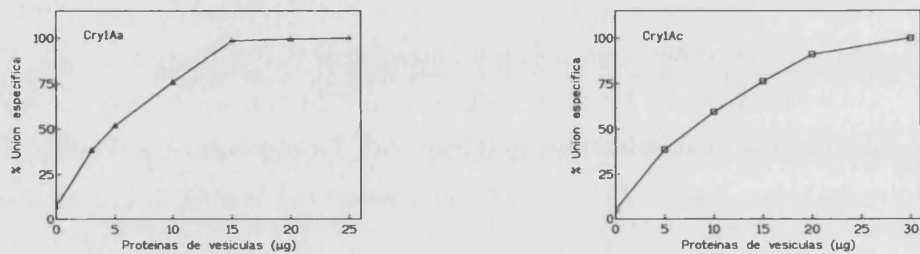


Figura 35.- Determinación de la cantidad óptima de proteínas de vesículas de intestinos de larvas de últimos estadios de *Lymantria monacha* para los ensayos ICP-receptor con Cry1Aa y Cry1Ac marcadas radiactivamente.

### 3- Determinación del tiempo de incubación

Como se observa en la Figura 36, los tiempos mínimos de incubación necesarios para alcanzar el equilibrio entre la concentración de proteínas de vesículas y la ICP marcada fueron de 1 h para Cry1Aa y de 2 h para Cry1Ac.

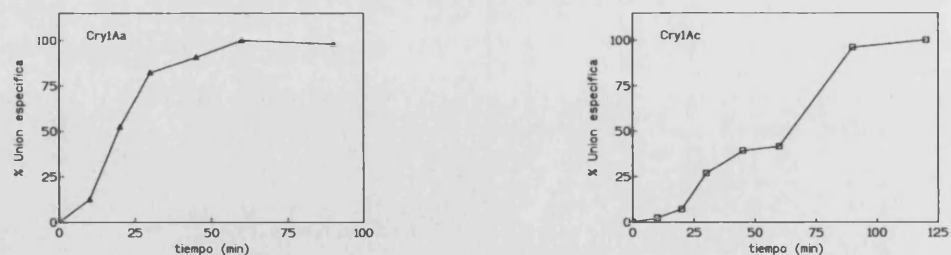


Figura 36.- Cinética de asociación de Cry1Aa y Cry1Ac a proteínas de vesículas de intestinos de larvas de últimos estadios de *Lymantria monacha*.

Una vez puestas a punto las condiciones de ensayo, se procedió a la realización de competencias homólogas y heterólogas con Cry1Aa y Cry1Ac en *Lymantria monacha* (Figura 37).



Figura 37.- Unión de <sup>125</sup>I-Cry1Aa (A) y <sup>125</sup>I-Cry1Ac (B) a proteínas de vesículas de intestinos de larvas de últimos estadios de *Lymantria monacha* en presencia de concentraciones crecientes de competidor no marcado: Cry1Aa (Δ) y Cry1Ac (□).

En la Tabla IX se muestran los parámetros cinéticos de la unión ( $K_d$  y  $R_t$ ) obtenidos mediante el análisis con el programa LIGAND de los resultados de los experimentos llevados a cabo. La constante de disociación aparente ( $K_d$ ) de Cry1Aa (34.40 nM) fue diez veces mayor que la  $K_d$  obtenida para Cry1Ac (3.55 nM), y su concentración de receptores ( $R_t$ ) (16.07 pmol/mg), unas siete veces mayor que la  $R_t$  de Cry1Ac (2.56 pmol/mg).

Tabla IX.- Parámetros obtenidos en las experiencias de unión de ICPs marcadas radiactivamente a vesículas de membrana de intestinos de larvas de últimos estadios de *Lymantria monacha*.

ICP	$K_d \pm SD$	$R_t \pm SD$
Cry1Aa	$34.40 \pm 15.61$	$16.07 \pm 11.44$
Cry1Ac	$3.55 \pm 1.04$	$2.56 \pm 0.26$

La ausencia de unión específica en los ensayos ligando-receptor cuando se incubó Cry1Ab con las proteínas de vesículas de larvas de último estadio de *Lymantria monacha*, está en aparente contradicción con los resultados de inhibición de la muda y de formación de poro *in vitro* obtenidos en larvas de segundo estadio de este insecto, que demuestran un claro efecto de la toxina sobre el mismo.

Con objeto de determinar si la ausencia de unión específica detectada en los experimentos de saturación de vesículas se debía al estadio de las larvas con las que se prepararon los mismos (últimos estadios), se realizó un experimento de saturación de vesículas preparadas a partir de larvas de primer-segundo estadio. La Figura 38 muestra la curva de saturación obtenida, confirmando la existencia de unión específica de Cry1Ab a vesículas de larvas de estadios tempranos del desarrollo.

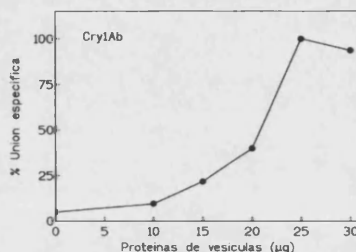


Figura 38.- Curva de saturación de proteínas de vesículas de larvas de primer y segundo estadio de *Lymantria monacha* con Cry1Ab marcada radiactivamente.

### 3. Evaluación de la eficacia en campo de distintas formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* frente a *Lymantria monacha*

Para llevar a cabo esta prueba de campo, dado que los pinos sobre los que se encontraba instalada esta plaga en Orihuela del Tremedal (Teruel) eran de gran altura, necesariamente teníamos que trasladar los insectos a una zona más idónea para el tratamiento manual. Inicialmente trasladamos huevos de *Lymantria monacha* distribuyéndolos equitativamente en las cortezas de los árboles marcados en cada parcela. Sin embargo, las bajas temperaturas durante los días siguientes a la eclosión de los huevos provocaron la muerte de la mayoría de las larvas recién salidas. Decidimos, pues, trasladar las larvas en segundo estadio, en el que no son tan sensibles a la manipulación y las bajas temperaturas, y podrían adaptarse más fácilmente a un hábitat diferente. No obstante, una vez más, la climatología adversa, con fuertes lluvias, impidió que pudiéramos acceder a la zona infestada donde estaba prevista la recolección de larvas en L2. Cuando mejoró el tiempo, las larvas ya se encontraban en tercer y cuarto estadio, momentos del desarrollo muy poco adecuados para el tratamiento con *Bacillus thuringiensis* y la comparación de eficacias de distintos productos, especialmente teniendo en cuenta los valores de LD<sub>50</sub> y LD<sub>90</sub> obtenidos para este insecto plaga, por lo que la prueba de campo tuvo que ser definitivamente cancelada.

## V DISCUSIÓN

---



***Thaumetopoea pityocampa*****1. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* frente a la plaga forestal *Thaumetopoea pityocampa* (procesionaria del pino)**

En este trabajo hemos estudiado la acción insecticida de diversas ICPs del tipo Cry1 frente a la procesionaria del pino, *Thaumetopoea pityocampa*, demostrando que estas proteínas pueden ser adecuadas para el control del insecto. De las 6 ICPs específicas para lepidópteros analizadas, tan sólo Cry1C y Cry1E resultaron no tóxicas en las condiciones de nuestro ensayo. Las toxinas que sí resultaron activas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B) permiten abordar la utilización de *Bacillus thuringiensis* en el control de la plaga en términos de diferentes combinaciones de proteínas que resulten más adecuadas para optimizar la efectividad del producto y permitan el diseño de tácticas para impedir el desarrollo de resistencia por parte del insecto.

Las tres ICPs del tipo Cry1A son tóxicas dentro de un rango de concentraciones similar y mantienen el orden de toxicidad: Cry1Ac > Cry1Ab > Cry1Aa, tanto a nivel de LD<sub>50</sub> como de LD<sub>90</sub>. Cry1B, sin embargo, mostró un comportamiento tóxico diferente, con una LD<sub>50</sub> muy alta, pero una LD<sub>90</sub> del mismo orden que las toxinas del tipo Cry1A.

Para comparar adecuadamente la eficacia de distintas toxinas o preparados, se debe tener en cuenta no sólo la LD<sub>50</sub> sino también la pendiente de la curva dosis-mortalidad obtenida en los ensayos de toxicidad, porque puede ocurrir que no existan diferencias significativas entre productos a nivel de LD<sub>50</sub> y sí las haya a nivel de LD<sub>90</sub>, que es en realidad el nivel mínimo de eficacia insecticida requerida para reducir una plaga en campo de manera aceptable (Reardon y Wagner, 1995). Los ensayos de intoxicación realizados con ICPs individuales en larvas de primer estadio demuestran que dosis equivalentes a un porcentaje de mortalidad igual o superior al 98% (probit  $\geq 7.0537$ ) provocaron un claro efecto citotóxico para todas las toxinas activas frente a *Thaumetopoea pityocampa* tan sólo 3 h 30 min después de la ingestión, cuando las larvas se alimentaron de pino tratado en el laboratorio.

En base a estos resultados, pues, tanto las ICPs del tipo Cry1A como Cry1B serían útiles para el control de la procesionaria del pino en campo.

La mayoría de las formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* que existen en el mercado actualmente han sido preparadas a partir de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*, y contienen fundamentalmente toxinas del grupo Cry1A, junto con Cry2A y Cry2B. Para el caso concreto de *Thaumetopoea pityocampa*, sin embargo, los resultados de los ensayos de toxicidad con las ICPs individuales sugieren que la introducción de Cry1B en los formulados a utilizar podría incrementar la eficacia de las aplicaciones en campo.



Las LD<sub>50</sub> y LD<sub>100</sub> obtenidas en los ensayos de toxicidad con las cuatro formulaciones comerciales utilizadas en nuestro estudio (Dipel, Foray 48B, Foray 76B y Cordalene) se encuentran dentro de un rango similar al de las LD<sub>50</sub> y LD<sub>100</sub> calculadas para las toxinas del grupo Cry1A, tal como era de esperar puesto que su materia activa está constituida principalmente por este tipo de ICPs. El análisis probit de la combinación de los valores dosis-mortalidad de los ensayos de toxicidad de bioinsecticidas y toxinas individuales, nos permitió, además, inferir la medida en que las distintas ICPs del tipo Cry1A contribuían a la toxicidad de los productos comerciales, ya que las casas comerciales son muy reacias, en general, a facilitar este tipo de información. Así, nos fue imposible obtener datos sobre la proporción de ICPs del tipo Cry1A en Foray 48B y Foray 76B; de Cordalene sabemos que no contiene Cry1Ab (información proporcionada por Ecogen Europa) y únicamente en el caso de Dipel conocemos su composición: 28% de Cry1Aa, 53% de Cry1Ab y 19% de Cry1Ac (Liu *et al.*, 1996). Con estos análisis hemos podido establecer que la toxicidad de Foray 48B, Foray 76B y Cordalene está mayoritariamente condicionada por su contenido en Cry1Ac, mientras que la toxicidad de Dipel, tal como indica su composición (53% de la materia activa del preparado corresponde a Cry1Ab), viene fundamentalmente determinada por su contenido en Cry1Ab. Todo esto apunta a que en realidad, las toxinas que se hallan en mayor proporción en los productos comerciales son las que determinan la efectividad de los mismos, al menos en el caso de *Thaumetopoea pityocampa*.

El estudio de toxicidad realizado con Cry1Ab y Cry1Ac (principales responsables de la efectividad de los productos comerciales objeto de análisis en este trabajo) en larvas de diferentes estadios de *Thaumetopoea pityocampa* demostró que hay una disminución de la susceptibilidad a las dos toxinas a medida que aumenta el estadio larvario. La pérdida de efectividad de los insecticidas en estadios avanzados del desarrollo es un hecho ampliamente documentado, y en el caso de *Bacillus thuringiensis*, existen diversas especies de insectos-plaga en los que se ha estudiado este fenómeno. Es el caso, por ejemplo, del coleóptero *Chrysomela scripta*, importante defoliador de árboles del género *Populus* (Bauer, 1990), o del escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata* (Ferro *et al.*, 1991), entre otros. De todos estos experimentos se deduce que la eficacia en campo de los bioinsecticidas con alto contenido en alguna de estas ICPs va a estar muy condicionada por el momento en el que se realicen las aplicaciones, de manera que para una dosis estándar de tratamiento, si las larvas tratadas son de primer estadio la mortalidad conseguida será mucho mayor que si los tratamientos se realizan cuando las larvas son de estadios posteriores.

Comparando la eficacia de Cry1Ab y Cry1Ac en larvas de primer y segundo estadio, pudimos observar también que la pérdida de actividad en el paso de L1 a L2 fue mayor en el caso de Cry1Ab que con Cry1Ac. No existen referencias en la bibliografía acerca de un comportamiento diferencial entre toxinas a este nivel, pero en principio, esto podría estar

reflejando diferencias en la variación a lo largo del desarrollo del tipo de unión de Cry1Ab y Cry1Ac a la membrana intestinal de *Thaumetopoea pityocampa*. Si esto fuera así, el hecho de que los tratamientos se realizaran con formulaciones enriquecidas en una u otra de estas dos toxinas podría tener una incidencia importante sobre su eficacia en campo, ya que las larvas en el campo no están sincronizadas y en la zona infestada coexisten larvas de diferentes estadios. Así, aquellas formulaciones con un mayor contenido en la ICP que pierde menor actividad a lo largo del desarrollo (Cry1Ac) podrían, en un contexto de heterogeneidad de estadios, ser mucho más eficaces que los productos enriquecidos en Cry1Ab, cuyo efecto tóxico experimenta una gran disminución a medida que aumenta el estadio larvario.

## **2. Mecanismo bioquímico de la toxicidad de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* frente a *Thaumetopoea pityocampa***

Mediante técnicas inmunocitoquímicas hemos podido detectar la unión *in vitro* al borde en cepillo del intestino medio de larvas de primer estadio de procesionaria de aquellas ICPs previamente determinadas como tóxicas frente a este insecto: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B. Por el contrario, Cry1C y Cry1E, que resultaron no activas en los ensayos de toxicidad, no mostraron unión alguna al epitelio intestinal de *Thaumetopoea pityocampa*. Estos resultados corroboran lo ya demostrado en otras especies de insectos-plaga, confirmando que también en el caso de *Thaumetopoea pityocampa*, la especificidad de la acción tóxica de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* está mediada por la existencia de sitios de unión específicos para estas toxinas en el intestino medio del insecto.

No obstante, mientras la unión *in vitro* de Cry1Ac y Cry1Ab al epitelio intestinal de larvas de primer estadio de *Thaumetopoea pityocampa* es similar para las dos toxinas, en larvas de tercer estadio, la unión detectada con Cry1Ab es menos uniforme y aparece más débil que la unión que se observa con Cry1Ac. Estas diferencias en la unión al borde en cepillo del intestino medio de larvas de tercer estadio se corresponden con las diferencias de actividad detectadas entre ambas toxinas en los ensayos de toxicidad realizados en larvas de segundo estadio tardías, reforzando nuestra idea inicial de que existe una variación diferencial a lo largo del desarrollo en los sitios de unión de cada una de estas toxinas a la membrana intestinal de *Thaumetopoea pityocampa*.

Una vez establecida la correlación entre la unión de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* a sitios específicos del epitelio intestinal de procesionaria y su toxicidad frente a este insecto, la caracterización del modelo de receptores para las distintas toxinas activas resulta fundamental para optimizar las aplicaciones en campo de los productos comerciales basados en *Bacillus thuringiensis*.

Mediante ensayos de unión a BBMV de primero-segundo estadio con Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac biotiniladas comprobamos la existencia de sitios de unión para estas toxinas. Las competencias heterólogas realizadas con las mismas demostraron que todas las ICPs del tipo Cry1A comparten al menos un sitio de unión, que, sin embargo, no es reconocido por Cry1B, lo cual sugiere que ambos tipos de toxinas se unen a receptores distintos en la membrana intestinal de este insecto.

Una de las tácticas descritas para retrasar la aparición de resistencia a *Bacillus thuringiensis* en campo, tanto con plantas transgénicas como con productos convencionales, es la mezcla de toxinas con distintos modos de acción (Roush, 1989). Desde este punto de vista, la inclusión de Cry1B en los formulados comerciales basados en *Bacillus thuringiensis* utilizados para el control de la procesionaria del pino podría resultar útil también como medida profiláctica para evitar el desarrollo de resistencia a *Bacillus thuringiensis*.

Los experimentos de competencia heteróloga realizados en larvas de primer-segundo estadio con Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac marcadas radiactivamente confirman que las tres toxinas son capaces de competir entre ellas por los sitios de unión al borde en cepillo de la membrana intestinal de *Thaumetopoea pityocampa*, tal como ya habíamos visto en las experiencias de quimioluminiscencia con las toxinas biotiniladas.

El análisis con el programa LIGAND de las curvas de desplazamiento obtenidas en las experiencias de competencia homóloga con toxinas radiactivas en el caso de larvas de estadios tempranos del desarrollo, ajustó nuestros resultados a un modelo de un único receptor para Cry1Aa y Cry1Ac, y un sistema de dos receptores para Cry1Ab. Las constantes de disociación aparentes ( $K_d$ ) calculadas para Cry1Aa y Cry1Ac fueron de un mismo orden, similar a la  $K_d$  de Cry1Ab (3.15 nM, 2.31 nM y 2.55 nM, respectivamente). La  $K_d$  de Cry1Ab, sin embargo, resultó ser diez veces menor (0.29 nM). Por su parte, la concentración de receptores (Rt) obtenida fue similar para Cry1Aa (2.01 pmol/mg) y para el sitio de menor afinidad de Cry1Ab (2.75 pmol/mg), mientras que la concentración de receptores de Cry1Ac fue alrededor de tres veces mayor (6.93 pmol/mg).

El hecho de que Cry1Ab cuente con dos sitios de unión, uno de ellos con una afinidad diez veces mayor a la del resto de los sitios caracterizados, y Cry1Ac disponga de una concentración de receptores tres veces mayor a la de las otras ICPs da razón de la mayor actividad de Cry1Ab y Cry1Ac frente a Cry1Aa observada en los ensayos de toxicidad con las toxinas individuales en larvas de primer estadio, y justifica también la toxicidad similar para este mismo estadio de las formulaciones enriquecidas en Cry1Ab ó Cry1Ac.

Las competencias homólogas con toxinas marcadas radiactivamente realizadas con vesículas de membrana de larvas de *Thaumetopoea pityocampa* de últimos estadios, nos permitieron comparar las características bioquímicas de la unión toxina receptor en estos

estadios con los parámetros obtenidos en las experiencias de competencia homóloga con vesículas de membrana de larvas de estadios tempranos. Las  $K_d$  y  $R_t$  obtenidas para Cry1Aa y Cry1Ac no presentaron diferencias significativas al comparar los dos momentos del desarrollo estudiados. Sin embargo, para Cry1Ab, sí detectamos una gran diferencia en el sistema de receptores de larvas de primeros estadios frente a las de últimos estadios, puesto que en estas últimas desaparece uno de los dos sitios de unión a Cry1Ab que aparecían en las larvas pequeñas, precisamente el de mayor afinidad.

Estos resultados proporcionan la base bioquímica de la pérdida de actividad de Cry1Ab (significativamente mayor que la que experimenta Cry1Ac) detectada a lo largo del desarrollo.

*Thaumetopoea pityocampa* es la primera especie de insectos-plaga en la cual se han detectado evidencias de cambio en los sitios de unión específica a las ICPs de *Bacillus thuringiensis* no asociadas a fenómenos de resistencia sino a eventos propios del desarrollo larvario, y como ya hemos comentado anteriormente, esto puede tener una gran incidencia sobre la eficacia final de las formulaciones comerciales en campo.

Este fenómeno pone de manifiesto la prioridad de centrar la investigación básica del modo de acción de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* en la identificación de las moléculas receptoras del epitelio intestinal. Conocer qué función tienen en la membrana del intestino de los insectos, qué genes las codifican y cómo se regulan, puede ser tremendamente interesante para entender mejor el mecanismo de la acción tóxica de las  $\delta$ -endotoxinas y abordar de una manera más racional la mejora de la eficacia de este bioinsecticida.

### **3. Evaluación de la eficacia en campo de distintas formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* frente a *Thaumetopoea pityocampa***

Dado su carácter de plaga endémica, la puesta a punto de métodos de control eficaces de la procesionaria del pino es una cuestión prioritaria en los ámbitos de sanidad vegetal de nuestro país.

En la actualidad, se dispone de dos grupos fundamentales de productos para la realización de intervenciones masivas. Por una parte, los inhibidores del desarrollo, hasta hace poco tiempo representados sólo por el diflubenzurón, al que se le han sumado recientemente otra serie de productos de similares características de acción, como el flufenoxurón, hexaflumurón, etc. Y por otra parte, el grupo de los insecticidas microbiológicos basados en *Bacillus thuringiensis*, de los que prácticamente cada año aparecen nuevas formulaciones registradas. En ambos casos, los tratamientos se realizan con técnicas de ultra bajo volumen para conseguir una mejor cobertura y un menor gasto de materia activa, y ambos tipos de productos aseguran un mínimo impacto sobre la flora y fauna beneficiosa gracias a su gran especificidad. Sin embargo, aunque tanto uno como otro

son insecticidas de ingestión, su modo de acción es muy diferente. Frente al modo de acción de *Bacillus thuringiensis*, descrito en la introducción de este trabajo, los inhibidores del crecimiento actúan interfiriendo en el mecanismo de formación de la quitina e impidiendo la muda, de manera que los insectos eliminan la cutícula del estadio anterior, pero son incapaces de formar la nueva cutícula y mueren deshidratados.

Los resultados de las aplicaciones en campo sobre procesionaria con inhibidores del crecimiento y *Bacillus thuringiensis* parecen otorgar una mayor eficacia a los primeros, y de ahí que este tipo de productos sea muy ampliamente utilizado para el control de esta plaga forestal en la actualidad. Una sensibilidad no dependiente del estadio larvario y una menor degradabilidad de los productos son probablemente las causas de esta mayor efectividad. La optimización del uso en campo de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Thaumetopoea pityocampa*, pues, pasa por mejorar su eficacia a estos dos niveles.

En este trabajo hemos intentado también abordar este aspecto fundamentalmente aplicado del uso de *Bacillus thuringiensis*, para comprobar si los resultados obtenidos en el laboratorio se correlacionan con lo que realmente ocurre en el campo y, en base al estudio básico del modo de acción de las ICPs en este insecto específico, proponer alternativas para mejorar su eficacia. Así, nos interesaba investigar:

- Si la eficacia en campo de los bioinsecticidas utilizados en nuestro estudio es suficiente para conseguir un control adecuado de esta plaga forestal. A este respecto, ya existe información procedente de los resultados de pruebas de campo realizadas en los años 85-93 con diversas formulaciones comerciales: Foray 48B, Dipel, Cóndor, Bactospeine, Bt Ecotech "Pro", etc., llevados a cabo por el Servicio de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente (información amablemente cedida por D. Eduardo Obama), que indica una gran efectividad de *Bacillus thuringiensis* en pinares de todo el país, con niveles de eficacia de alrededor del 98-99%. Operaciones de control en otras zonas de infestación de procesionaria en el área mediterránea han demostrado también la alta eficacia de *Bacillus thuringiensis* (Niccoli y Tiberi, 1985).
- Si la eficacia en campo de estos mismos bioinsecticidas es diferente, según el estadio larvario tratado, tal como indican los resultados de los bioensayos en el laboratorio.

La climatología adversa durante los tratamientos sobre larvas de primer y segundo estadio en la prueba de campo de Ademuz nos impidió comparar las eficacias de los bioinsecticidas utilizados. Aunque la mortalidad conseguida con Foray 76B fue del 87.3%, el efecto de lavado del material activo redujo la mortalidad obtenida con Foray 48B, Dipel y Cordalene a porcentajes entre el 40-50%, que son a todas luces insuficientes para un control eficaz de una plaga en campo. La baja persistencia de *Bacillus thuringiensis* en el medio,

pese a ser una cualidad deseable por lo que respecta a la protección del medio ambiente, también constituye una de las mayores limitaciones a su uso, ya que de esta manera la eficacia de los productos se encuentra determinada por agentes que escapan totalmente al control humano, como la lluvia en nuestro caso, convirtiéndose en medios de control de eficacia poco predecible. La mejora de las formulaciones en referencia a las propiedades que le confieren una menor degradabilidad y una mayor persistencia, resulta pues, crítica a la hora de optimizar la utilización de *Bacillus thuringiensis* en el campo.

Tan sólo con uno de los formulados, Foray 76B, se consiguió un nivel de eficacia aceptable (87.3%), probablemente debido a una composición en materia no activa que mejoró las características de adhesión del producto final, y por tanto su permanencia en campo. A pesar de que no se obtuvo una mortalidad del 100% con este biopreparado, como así fue en la parcela tratada con diflubenzurón (Consult), la comparación de la evolución de la mortalidad a lo largo del tratamiento en los dos casos permite distinguir una mayor rapidez de actuación de *Bacillus thuringiensis* frente al preparado cuyo principio activo es la inhibición de la muda (tan sólo una semana después del tratamiento Foray 76B había conseguido ya una mortalidad del 75%, mientras que Consult sólo llegó al 45%). Esto tiene una importancia considerable puesto que una mayor rapidez de actuación implica niveles menores de defoliación inicial, que es en definitiva lo que se pretende. Desde este punto de vista, los bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* poseen una ventaja sobre otros insecticidas biorracionales, como los inhibidores de la muda, pese a que estos últimos tienen a su favor que son muy fiables en cuanto a su eficacia y por tanto cuentan con muchos adeptos entre los técnicos encargados de los controles de plagas forestales. En cuanto al impacto sobre el medio ambiente, *Bacillus thuringiensis* resulta claramente menos dañino puesto que los formulados basados en este microorganismo pueden aplicarse sin diluir o diluidos con agua, mientras que los productos con diflubenzurón como ingrediente activo se han venido utilizando como vehículos como aceites minerales y gasoil, y sólo en contadas ocasiones con aceites vegetales no contaminantes.

En la prueba de campo a pequeña escala realizada en Bétera sobre larvas mayoritariamente de tercer y cuarto estadio, se obtuvo una mayor eficacia de Foray 48B y Cordalene frente a Dipel. Sin embargo, en ningún caso se llegó al 98-99% de mortalidad obtenida en otras pruebas de campo. Esto se debe probablemente al efecto de disminución de la sensibilidad a *Bacillus thuringiensis* en larvas de estadios mayores, demostrada para Cry1Ab y Cry1Ac en los ensayos de toxicidad en distintos momentos del desarrollo.

Dipel es el único bioinsecticida de los utilizados en este trabajo que está enriquecido en Cry1Ab, la ICP que mostró una notable pérdida de actividad en larvas de estadios mayores debida a la desaparición de uno de los receptores existentes en la membrana intestinal de las larvas de primeros estadios. Estos resultados evidencian la incidencia en

la eficacia en campo del fenómeno de pérdida de toxicidad de las ICPs a lo largo del desarrollo, de manera que en el caso de procesionaria, Cry1Ab, que en principio podría ser tan útil como Cry1Ac para el control de la plaga si las larvas son pequeñas, resulta claramente poco indicada si en el momento del tratamiento la plaga está bastante desarrollada y existe un grado de desincronización grande.

El momento de aplicación de las formulaciones comerciales es, pues, otro punto crítico para conseguir el éxito del tratamiento. Una correcta y concienzuda monitorización de las áreas infestadas y del grado de desarrollo de la plaga puede ser de gran utilidad para acertar el momento más adecuado para el tratamiento de las larvas y el tipo de formulado a utilizar (enriquecido en unas toxinas u otras según la sensibilidad de las larvas y el estadio de las mismas), y conseguir así una mayor eficacia. En general, se obtienen porcentajes de mortalidad más altos cuando las larvas son de primeros estadios porque son más sensibles a la acción tóxica de *Bacillus thuringiensis* y además se evita la mayor defoliación que causan las larvas grandes.

En *Thaumetopoea pityocampa* hemos visto que los resultados obtenidos en el laboratorio se han confirmado en el campo, lo cual pone de manifiesto la importancia de los estudios de modo de acción y la necesidad de profundizar en el conocimiento de aspectos básicos de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* para posteriormente poder optimizar las estrategias de su uso en campo.

## *Lymantria monacha*

### 1. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* frente a la plaga forestal *Lymantria monacha*

Los ensayos de toxicidad con formulaciones comerciales basadas en las ICPs de *Bacillus thuringiensis* en *Lymantria monacha* nos permitieron estudiar la utilización de *Bacillus thuringiensis* para el control de esta plaga forestal.

Al comparar la toxicidad del producto comercial Dipel en las poblaciones naturales de *Lymantria monacha* procedentes de Alemania y de bosques españoles, hemos encontrado diferencias en su susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis*. Una dosis de 7.6 IU/larva de Dipel mató al 80% de la población de *Lymantria monacha* procedente de Orihuela del Tremedal, y tan sólo al 50% de la población alemana. Esto nos hace pensar en una variabilidad entre las poblaciones de insectos en lo que a su susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis* se refiere, que ya se ha descrito en otros casos, como el de *Lymantria dispar* (una plaga forestal de la misma familia, Lymantriidae, que ataca árboles del género *Quercus* principalmente), para la que se encontraron valores de LD<sub>50</sub> frente a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* significativamente distintos según la población en que fueron determinados (Rossiter *et al.*, 1990).

La diversidad en los métodos utilizados para realizar bioensayos dificulta la comparación de la toxicidad de diferentes ICPs frente a distintos insectos. La Tabla X muestra un resumen de la toxicidad de estas proteínas frente a varios lepidópteros expresada en ng/cm<sup>2</sup>, tal como está expresada la toxicidad que nosotros hemos determinado en la población española de *Lymantria monacha* para las formulaciones comerciales Foray 48B (LD<sub>50</sub>: 478 ng/cm<sup>2</sup>) y Dipel (LD<sub>50</sub>: 950 ng/cm<sup>2</sup>) en los ensayos sobre dieta artificial. La toxicidad obtenida con estos biopreparados en *Lymantria monacha* es en general un orden de magnitud menor a la de las descritas previamente para *Manduca sexta*, *Heliothis virescens*, *Lymantria dispar*, *Plutella xylostela* o *Lobesia botrana* (Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990a; Wolfesberger, 1990; Ballester *et al.*, 1994; Piedrafita, 1996). Estos resultados resaltan la baja susceptibilidad de *Lymantria monacha* a *Bacillus thuringiensis*, factor que, obviamente, va a limitar el éxito de este patógeno microbiano como agente de control de esta plaga forestal.



## Discusión

**Tabla X.- LD<sub>50</sub> (ng/cm<sup>2</sup>) de varias ICPs de *Bacillus thuringiensis* en distintas especies de insectos plaga.**

Insecto	CryIA(a)	CryIA(b)	CryIA(c)	CryIB	CryIC	CryID	CryIE	referencia (*)
<i>Lobesia botrana</i>	130	7	77	174	No Tóxica	24	255	(1)
<i>Heliothis virescens</i>	157	7	2	-	>2.700	-	>2.700	(2),(3)
<i>Lymantria dispar</i>	-	1	425	-	-	-	-	(4)
<i>Manduca sexta</i>	20	20	9	-	111	-	73	(2),(3)
<i>Plutella xylostella</i>	293	15	44	35	-	-	-	(5)
<i>Spodoptera littoralis</i>	>1.350	-	-	-	93	-	88	(3)

\* (1) Piedrafita, 1996; (2) Van Rie *et al.*, 1989; (3) Van Rie *et al.*, 1990a; (4) Wolfesberger, 1990; (5) Ballester *et al.*, 1994

Los ensayos de toxicidad en *Thaumetopoea pityocampa* demostraron que el efecto del producto comercial Foray 48B estaba principalmente asociado a su contenido en Cry1Ac y, curiosamente, las LD<sub>50</sub> obtenidas en larvas de segundo estadio de *Lymantria monacha* para este formulado comercial son del mismo orden que la LD<sub>50</sub> de Cry1Ac en larvas de primer estadio de *Lymantria dispar* (Wolfesberger, 1990), indicando una toxicidad similar de esta toxina en las dos plagas. Sin embargo, Cry1Ab en *Lymantria dispar* (Wolfesberger, 1990) resulta del orden de 1000 veces más tóxica que Dipel (que contiene un 53% de Cry1Ab) en *Lymantria monacha*. Todo esto sugiere que en *Lymantria monacha*, al revés que en *Lymantria dispar*, Cry1Ab es muy poco tóxica y por lo tanto es Cry1Ac la que determina la eficacia de las formulaciones comerciales, incluso en aquellas que, como Dipel, están enriquecidas en Cry1Ab. Esta es probablemente la razón por la cual las LD<sub>50</sub> (7.6 IU/larva) y LD<sub>50</sub> (15.2 IU/larva) obtenidas en los ensayos de ingestión forzada con el preparado comercial Dipel en larvas de tercer estadio de *Lymantria monacha* procedentes de Alemania fueron del mismo orden que las obtenidas, en ensayos del mismo tipo realizados por Ratcliffe y Yendol (1993) para la formulación comercial Foray 48B en larvas de tercer estadio de *Lymantria dispar* (LD<sub>50</sub>: 2.7 IU/larva y LD<sub>50</sub>: 21.1 IU/larva).

Dados los rangos de toxicidad de los dos formulados comerciales estudiados en la mónica, que implican el uso de dosis muy altas en los bioensayos, decidimos realizar los ensayos de toxicidad con las ICPs individuales purificadas utilizando dosis subletales y

evaluando entonces una manifestación típica y bien conocida del efecto tóxico inducido por *Bacillus thuringiensis*, que es su capacidad para inhibir la ingesta y provocar disminución del peso y retraso en el desarrollo de distintas especies de insectos (Gill *et al.*, 1992; Honée y Visser, 1993; Farrar y Ridgway, 1995). Al parar de comer, la larva puede, si la dosis ingerida de toxina es baja, degradar la toxina y reparar el intestino, reemplazando las células dañadas, de manera que si no se expone de nuevo a la toxina una vez reiniciada la toma de alimento, la recuperación es definitiva (Retnakaran *et al.*, 1983; Spies y Spence, 1985; Ramachandran *et al.*, 1993).

Este tipo de bioensayos ha sido llevado a cabo en diversas especies (van Frankenhuyzen *et al.*, 1991; de León e Ibarra, 1995; Liang *et al.*, 1995; Sims *et al.*, 1996) y en general en todos ellos la inhibición de la ingesta ha resultado altamente dependiente de la dosis y en algunos casos, incluso más sensible que los ensayos dosis-mortalidad (Sims *et al.*, 1996).

Los resultados de los ensayos con dosis subletales de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en *Lymantria monacha* indican que las tres toxinas tienen el efecto de impedir el paso de segundo a tercer estadio, y el orden de efectividad a este nivel fue: Cry1Aa > Cry1Ac > Cry1Ab.

Sin embargo, en los ensayos de intoxicación de larvas que fueron forzadas a ingerir una cantidad concreta (1.6 µg) de cada una de estas tres toxinas y también de Cry1B, el orden de efectividad en cuanto a efecto citotóxico provocado fue distinto: Cry1Ac > Cry1Aa > Cry1Ab = Cry1B. Con esta dosis, además, Cry1Ab y Cry1B ni siquiera llegaron a provocar daño observable a nivel intestinal.

La menor efectividad conseguida por Cry1Ab frente a las otras dos ICPs de tipo Cry1A en estos dos tipos de ensayo corroboran la baja actividad predicha para esta toxina en *Lymantria monacha* en base a las LD<sub>50</sub> de las curvas dosis-mortalidad obtenidas con los bioinsecticidas comerciales en este insecto. A pesar de ello, el hecho de que Cry1Ab sí provoque un efecto de retraso del desarrollo sobre *Lymantria monacha* pero no provoque destrucción del epitelio intestinal para una dosis con la que Cry1Ac y Cry1Aa tienen un claro efecto citotóxico, induce a pensar que Cry1Ab presente algunas diferencias respecto al modo de acción de las otras toxinas. Esta no es la primera vez en la que se descubre una ausencia de correlación en fenómenos relacionados con la acción *in vivo* de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* sobre el intestino medio de insectos-plaga. Así, en *Bombyx mori*, se ha descrito la existencia de unión *in vivo* de Cry1Ab al borde en cepillo de la membrana intestinal y sin embargo, ausencia de destrucción intestinal para dosis que resultaban altamente citotóxicas para otras toxinas (Yi *et al.*, 1996).

El incremento en el número de excepciones a la noción aceptada de que la existencia de unión de las ICPs al intestino medio del insecto se correlaciona con la toxicidad de las

mismas, sugiere que, realmente, no es la unión simplemente, sino los eventos posteriores a la unión toxina-receptor, como la integración irreversible de la toxina en la membrana intestinal y la formación de canales iónicos, los que determinan esa toxicidad, entendida como capacidad de provocar la muerte de las larvas susceptibles.

En el caso de Cry1Ab en *Lymantria monacha*, podría ocurrir que la unión inicial toxina-receptor en la membrana intestinal provoque la inhibición de la ingesta que después redundaría en una pérdida de peso e inhibición del desarrollo, pero no se llegue a formar el número suficiente de poros para propiciar el desequilibrio osmótico y la destrucción celular masiva a corto plazo.

La técnica de perfusión luminal del intestino permite la medida de potenciales transepiteliales (Vte) y es una herramienta útil para estudiar la capacidad de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* para formar canales iónicos en la membrana intestinal de las larvas. Mediante esta técnica determinamos que Cry1Ab, al igual que Cry1Ac, es capaz de provocar un potencial transepitelial significativo, y se diferencia de Cry1B que, aunque tampoco provocó efecto citotóxico en los ensayos de intoxicación, no genera un Vte significativamente distinto del control sin toxina.

Los resultados de estas experiencias indican que Cry1Ab sí es capaz de formar poros *in vitro* y por lo tanto, en principio, su modo de acción sería similar al propuesto para el resto de las ICPs. La ausencia de efecto citotóxico podría deberse, pues, a una cuestión de la dosis suministrada. La intoxicación de larvas con una dosis 1000 veces superior a la utilizada con anterioridad sí permitió detectar destrucción del tejido intestinal, confirmando que Cry1Ab es activa frente a *Lymantria monacha*, pero sin querer decir con ello que pueda considerarse realmente efectiva, porque su acción tóxica puede producirse a concentraciones tan altas que estemos fuera del rango de toxicidad operativo para ser utilizada en programas de control.

La técnica de perfusión luminal y la medida del potencial transepitelial resultó útil a la hora de discriminar entre toxinas activas (Cry1Ab y Cry1Ac) y no activas (Cry1B). Sin embargo, la concentración necesaria para producir un efecto dado varió mucho menos extensamente que la sensibilidad de *Lymantria monacha*, ya que las diferencias en el Vte generado por Cry1Ab y Cry1Ac no fueron significativas, aún cuando las dosis necesarias para provocar efecto citotóxico por un lado, y las dosis subletales necesarias para inhibir la muda, por otro, estaban indicando que Cry1Ac es más tóxica que Cry1Ab. Resultados similares fueron obtenidos por Peyronnet *et al.* (1997) con las medidas del potencial de membrana apical en *Lymantria dispar*.

Las diferencias no significativas en el Vte generado por las ICPs activas en estos insectos no se correlacionan con su toxicidad, que sí es claramente diferente. Esto puede deberse al hecho de que la técnica de perfusión luminal, por tratarse de un ensayo *in vitro*,

esté permitiendo un acceso total de las toxinas a los receptores de la superficie de la membrana intestinal, que *in vivo* podrían no ser completamente accesibles. El hecho de que la capacidad de una toxina para formar poros en la membrana intestinal del insecto no se correlacione con su actividad tóxica frente al mismo, sin embargo, puede estar indicando también la existencia de factores adicionales, en pasos anteriores a la formación de poro, que influyen el grado de toxicidad de las ICPs *in vivo*.

La interacción de la toxina con el epitelio intestinal parece ser un proceso de dos pasos con un primer reconocimiento reversible del sitio de unión y una segunda asociación irreversible de la toxina a la membrana epitelial (Wolfesberger *et al.*, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a; Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990a; Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995). El paso irreversible que sigue a la unión reversible de las ICPs al borde en cepillo de la membrana intestinal parece estar asociado a la inserción de parte o toda la molécula de toxina en la membrana, y esta inserción se cree necesaria para la formación de canales de aproximadamente 1 nm de diámetro, que median el incremento de la permeabilidad de la membrana (Gill *et al.*, 1992; Knowles y Dow, 1993). Hasta ahora, sin embargo, no se ha podido discriminar entre la posibilidad de un canal formado sólo por moléculas de toxina o por una combinación de toxinas y componentes de la membrana epitelial. El mecanismo molecular concreto que desencadena la apertura de canales iónicos en la membrana intestinal a partir de la unión irreversible de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* a receptores específicos de la misma *in vivo* es aún desconocido y es precisamente a este nivel donde podrían estar actuando multitud de factores moduladores cuya actividad diferencial determinase las diferencias de actividad observadas entre toxinas.

## **2. Mecanismo bioquímico de la toxicidad de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* frente a *Lymantria monacha***

Los experimentos de unión a secciones de tejido intestinal de larvas de *Lymantria monacha* permitieron detectar mediante técnicas inmunohistoquímicas la unión específica a la membrana de borde en cepillo de las toxinas determinadas como activas en ensayos de toxicidad (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac), y ausencia de unión para Cry1B (que resultó no ser capaz de formar poros en las experiencias de perfusión luminal).

Podemos pensar, pues, que en principio, los efectos de *Bacillus thuringiensis* sobre *Lymantria monacha* (ya sea a nivel de inhibición de la muda, de destrucción epitelial, o de capacidad de formar canales iónicos *in vitro*) pueden asociarse a la existencia de receptores específicos en la membrana intestinal del insecto, aunque como ya se ha comentado anteriormente, la interacción toxina-receptor es realmente compleja y a pesar de que la unión de las  $\delta$ -endotoxinas al borde en cepillo de la membrana intestinal de los insectos es

un prerrequisito indispensable para su actividad insecticida, esa unión por sí sola no es suficiente para justificar su actividad tóxica.

Los experimentos de competencia homóloga y heteróloga en vesículas de membrana de larvas de *Lymantria monacha* de últimos estadios con toxinas marcadas radiactivamente corroboraron la existencia de unión toxina-receptor *in vitro* en el caso de Cry1Aa y Cry1Ac, pero sorprendentemente no se detectó unión específica en el caso de Cry1Ab.

El análisis con el programa LIGAND de las curvas de desplazamiento obtenidas en las experiencias de competencia homóloga con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Aa y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac, ajustó nuestros resultados a un modelo de un único receptor en los dos casos. Como demuestran las competencias heterólogas, además, las dos toxinas comparten los mismos sitios de unión.

La constante de disociación aparente (Kd) obtenida para Cry1Aa fue alrededor de diez veces mayor que la calculada en el caso de Cry1Ac (34.40 nM y 3.55 nM, respectivamente). Sin embargo, Cry1Ac tiene una concentración de receptores (Rt) unas seis veces menor que la concentración de receptores determinada para Cry1Aa (2.56 pmol/mg y 16.07 pmol/mg).

Los parámetros bioquímicos obtenidos en *Lymantria monacha*, que caracterizan el sistema de receptores de Cry1Aa y Cry1Ac en este insecto explicarían el hecho de que Cry1Aa sea capaz de inhibir la muda a unas dosis para las que Cry1Ac aún no manifestaba ningún efecto a este nivel, aún cuando los ensayos de intoxicación por ingestión forzada demuestran que para una dosis letal concreta, Cry1Ac genera un daño intestinal significativamente mayor que Cry1Aa.

Cuando las larvas se tratan con dosis subletales de las ICPs individuales (suficientemente bajas para no saturar los receptores existentes), la probabilidad de que en el momento después de la ingestión la toxina encuentre un sitio de unión sería mayor para aquellas ICPs que tengan una mayor concentración de receptores, independientemente de la afinidad de cada toxina por su sitio de unión, puesto que en este caso el ligando se encuentra en muy pequeña cantidad. Inmediatamente después de que la larva haya ingerido la toxina entra en acción el primer efecto de inhibición de la ingesta, que los insectos utilizan como barrera de defensa frente a una sustancia exógena potencialmente tóxica. Como la dosis ingerida no es lo suficientemente alta para que se forme el número de poros necesario para alterar drásticamente el equilibrio osmótico celular, no hay efecto letal, sino pérdida de peso y retraso en el desarrollo, y una vez el pequeño daño causado es reparado, la larva recobra su nivel metabólico normal. Así se explicaría que, en los ensayos de toxicidad realizados con dosis subletales, Cry1Aa (que tienen una concentración de sitios de unión seis veces mayor que Cry1Ac) necesite una dosis inferior que Cry1Ac para impedir

la muda a tercer estadio en el 50% de las larvas tratadas, a pesar de que tiene una afinidad por sus receptores diez veces menor que Cry1Ac.

A medida que se aumentan las dosis de tratamiento, se van saturando los sitios de unión de las toxinas en el epitelio intestinal en función de sus afinidades relativas por los receptores, y aunque las larvas también paren de comer inmediatamente después de la ingesta, las dosis ingeridas son suficientemente altas para que los canales iónicos generados provoquen un incremento de la permeabilidad de membrana que resulte en grandes desequilibrios osmóticos y dé lugar a un efecto letal.

En condiciones de exceso de ICP, la afinidad de la toxina por sus sitios de unión prevalece a la hora de que las ICPs encuentren sus receptores en la membrana intestinal más fácilmente y puedan, por tanto, ocasionar antes un efecto citotóxico significativo. Aún así, el que la destrucción del epitelio intestinal sea mayor o menor, probablemente no va a estar determinado sólo por la mayor o menor facilidad con que las toxinas se unan a sus receptores específicos en el epitelio intestinal, según la dosis aplicada y en base a su concentración de sitios de unión y su afinidad por los mismos, sino también por eventos posteriores a la unión toxina-receptor, como son su capacidad para integrarse en la membrana del intestino y la formación de poros en la misma, que como ya hemos comentado con anterioridad, pueden estar influidos por otros factores moduladores específicos.

La dosis suministrada, no obstante, continúa siendo un punto crítico en la optimización de estrategias de uso de los insecticidas en general. A este nivel, la utilización de *Bacillus thuringiensis* como agente de control requiere determinar muy cuidadosamente el rango de dosis a aplicar para asegurar el efecto deseado.

El tratamiento con dosis subletales podría suponer el fracaso total de una operación de control basada exclusivamente en este bioinsecticida, puesto que las larvas dejarían de comer pero no morirían y tras un lapso de tiempo podrían reiniciar su comportamiento alimentario normal, continuando la defoliación. Ensayos de toxicidad realizados utilizando formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* para el control de *Lymantria dispar* demuestran que la dosificación en gotas más pequeñas y de mayor densidad mejora ostensiblemente la eficacia de los bioinsecticidas (Ratcliffe y Yendol, 1993). Esto puede ser debido a que para una misma velocidad de ingesta, tipo de dieta, efecto deterrente de las preparaciones y homogeneidad de la distribución de las mismas, la larva parará de comer inmediatamente después de haber ingerido una cierta cantidad de toxina, que será tanto más alta (y por tanto de mayor eficacia) cuanto mayor sea la densidad de la gota.

Sin embargo, no siempre interesa conseguir que la larva ingiera una dosis letal. En programas de control integrado, en los que *Bacillus thuringiensis* se combina con otros agentes de control, normalmente es suficiente utilizar dosis subletales del mismo para

conseguir un control eficaz. Así, se ha demostrado que la acción conjunta de *Bacillus thuringiensis* y virus de la poliedrosis nuclear en dosis subletales fue más efectiva para el control de plagas que dosis normales de cada uno de los microorganismos utilizados independientemente en *Lymantria dispar* (Tompkin *et al.*, 1986) y en *Lymantria monacha* (Schönherr y Ketterer, 1979). De igual forma, el éxito en la interacción del efecto de *Bacillus thuringiensis* y el control ejercido por enemigos naturales de las plagas se explica por el hecho de que las larvas tratadas con *Bacillus thuringiensis* se mantuvieron en estadios de desarrollo susceptibles al parasitismo durante más tiempo que las larvas no tratadas (debido al efecto de inhibición del desarrollo que el bioinsecticida tiene sobre el insecto diana). Este es el caso de *Lymantria dispar*, en el que Ticehuerst *et al.* (1982), Weseloh *et al.* (1983) y Webb *et al.* (1989) detectaron un incremento del parasitismo de poblaciones naturales de *Cotesia (Apanteles) melanoscelus* (Himenoptero: Braconidae) tras la utilización de *Bacillus thuringiensis*.

Los resultados obtenidos en *Lymantria monacha* ponen de relieve la importancia de realizar estudios de modo de acción y determinación de las características de unión de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* para cada plaga susceptible de ser controlada con este insecticida biológico. Estos conocimientos facilitarán una elección racional del formulado óptimo para cada situación. Así, para un control basado exclusivamente en este bioinsecticida, un biopreparado enriquecido en aquellas ICPs más tóxicas para el insecto permitiría disminuir la dosis letal necesaria para utilizar en los tratamientos en campo, con el consiguiente aumento de eficacia y ahorro económico. En cambio, en programas de control integrado, en los que la utilización de *Bacillus thuringiensis* se combina con otros agentes de control biológicos o químicos, y se aplican dosis subletales del mismo, puede ser interesante elegir formulaciones enriquecidas en las toxinas más efectivas a estas dosis (que como ya hemos visto en *Lymantria monacha*, no necesariamente son las mismas que las toxinas más efectivas a dosis letales).

Vemos, pues, como la optimización de la composición y la dosis a utilizar de los formulados basados en *Bacillus thuringiensis* puede mejorar notablemente su rendimiento como bioinsecticida. Además, su demostrada acción sinérgica con otros agentes de control (que contribuyen a paliar su baja eficacia en algunos casos) hacen de este patógeno microbiano un arma muy recomendable en el manejo integrado de plagas, favoreciendo su implantación definitiva en el mercado mundial de plaguicidas.

Los ensayos de unión *in vitro* de Cry1Ab a secciones histológicas y proteínas de vesículas de *Lymantria monacha* dieron resultados contradictorios: mientras que sí se observa la unión de esta toxina a secciones de tejido intestinal del insecto, no es posible detectar unión específica en los experimentos de asociación de Cry1Ab a proteínas de vesículas. La única diferencia en ambos experimentos fue el estadio de las larvas de

*Lymantria monacha* en cada uno de ellos. Mientras las secciones histológicas fueron preparadas a partir de larvas de primer estadio tardías, las proteínas de vesículas fueron de larvas de últimos estadios. La pérdida de unión *in vitro* de Cry1Ab a los receptores específicos de la membrana intestinal de *Lymantria monacha* en larvas de estadios avanzados del desarrollo podría ser un fenómeno similar al descrito en *Thaumentopoea pityocampa* en la primera parte de este trabajo, en el que la desaparición de un sitio de unión de alta afinidad parece ser la causa de la disminución de la toxicidad de Cry1Ab en larvas de últimos estadios.

Los experimentos de asociación de Cry1Ab a proteínas de vesículas de larvas de primer-segundo estadio de *Lymantria monacha*, demostraron que sí existía unión específica *in vitro* en estos estadios. La curva de saturación, sin embargo, no muestra el perfil típico obtenido normalmente con las ICPs de *Bacillus thuringiensis*, sino que posee un tramo cóncavo antes de llegar a la saturación que está reflejando un claro efecto cooperativo de las moléculas de Cry1Ab en su unión a los sitios específicos del epitelio intestinal.

Estos resultados sugieren que la pérdida de unión a la membrana intestinal que acompaña a la disminución de toxicidad de Cry1Ab a medida que aumenta el estadio de las larvas tratadas parece tratarse de un fenómeno no exclusivo de *Thaumentopoea pityocampa*, sino también propio de otros insectos. Es el caso de *Lymantria monacha*, como ya hemos visto, y también podría ser probablemente el caso de *Lymantria dispar*. En este insecto, Wolfesberger (1990), determinó una relación inversa entre la toxicidad de Cry1Ab y su afinidad por los sitios de unión específica al borde en cepillo de la membrana intestinal: en tanto que la toxicidad de Cry1Ab era mucho mayor que la de Cry1Ac ( $LD_{50}$  de 1.08 ng/cm<sup>2</sup> y 425 ng/cm<sup>2</sup>, respectivamente), la constante de disociación aparente de Cry1Ab era alrededor de ocho veces mayor que la de Cry1Ac (19.8 nM y 2.03 nM, respectivamente). En este trabajo, la toxicidad fue determinada en ensayos con larvas de *Lymantria dispar* de primer estadio, mientras que en las competencias homólogas con Cry1Ab y Cry1Ac marcadas radiactivamente se utilizaron proteínas de vesículas de larvas de último estadio de este insecto. A la luz de nuestro trabajo con las otras dos plagas forestales, los resultados obtenidos en *Lymantria dispar* pueden explicarse también por una pérdida de actividad de Cry1Ab a lo largo del desarrollo.

Cry1Ab se configura, pese a su gran homología estructural y de secuencia con Cry1Aa y Cry1Ac, como una toxina especial desde el punto de vista de que es capaz de reconocer específicamente una molécula de la membrana intestinal que varía a lo largo del desarrollo (ya sea porque tiene un patrón de expresión diferencial en diferentes estadios o porque sufre modificaciones post-traduccionales en distintos momentos del desarrollo). La unión de Cry1Ab a esta molécula provoca un claro efecto tóxico sobre el insecto tratado al menos en tres importantes plagas forestales. Sería muy interesante extender el estudio de



la variación de la susceptibilidad a las ICPs de *Bacillus thuringiensis* en diferentes estadios del desarrollo a más insectos plaga susceptibles de ser controlados con este microorganismo, y abordar el trabajo de identificar la molécula receptora de Cry1Ab y sus mecanismos de cambio, porque esta información sería probablemente de gran interés a muchos niveles.

Las implicaciones a nivel de investigación básica y aplicada de este fenómeno de modificación del sistema de receptores a lo largo del desarrollo pueden ser muy grandes, desde facilitar una perspectiva diferente a la interpretación del modo de acción de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* apoyada en los eventos propios de la bioquímica y la biología molecular del desarrollo, hasta la gestión de estrategias de uso en campo de este bioinsecticida que contemplen la optimización de la eficacia en base a la susceptibilidad diferencial a las toxinas en los distintos estadios larvarios que pueden coexistir en una zona infestada.

Así, se abren nuevas perspectivas al avance en el conocimiento del modo de acción de *Bacillus thuringiensis* y la posibilidad de la mejora de su eficacia como insecticida, que le permitiría convertirse en una alternativa ecológica sólida frente a los insecticidas químicos.

### **3. Evaluación de la eficacia en campo de distintas formulaciones comerciales basadas en *Bacillus thuringiensis* frente a *Lymantria monacha***

La utilización de *Bacillus thuringiensis* para el control en campo de *Lymantria monacha* en Europa ha sido escasa y se ha caracterizado en la mayoría de los casos por una baja eficacia en relación a otros insecticidas de síntesis química: endosulfán, diflubenzurón, trichlorfón, etc. (Glowacka-Pilot, 1986; Bejer, 1986; Soria *et al.*, 1988; Jensen, 1991) o biológicos, como el virus de la poliedrosis nuclear (Altenkirch *et al.*, 1986).

Nuestro objetivo al planificar una prueba de campo con formulaciones de *Bacillus thuringiensis* para el control de este insecto fue fundamentalmente, en base al estudio previo del modo de acción de las ICPs individuales en el mismo, el de investigar la posibilidad de mejorar su eficacia mediante la optimización de la mezcla de toxinas en el biopreparado.

Sin embargo, la climatología adversa (lluvias y bajas temperaturas) nos impidieron realizar la prueba de campo programada, poniendo de manifiesto, una vez más, cuán crítico es para incrementar su eficacia conseguir que los preparados comerciales de *Bacillus thuringiensis* aumenten su permanencia en campo.

Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con Dipel y Foray 48B en este insecto llevados cabo en el laboratorio, y la comparación con las LD<sub>50</sub> de las ICPs de *Bacillus thuringiensis* obtenidas en otras plagas parecen indicar que efectivamente, el efecto de este bioinsecticida es menor sobre *Lymantria monacha*, y de ahí probablemente la baja eficacia conseguida en las aplicaciones en campo realizadas hasta ahora.

A pesar de ello, *Bacillus thuringiensis* puede ser útil en programas integrados de control biológico de esta plaga forestal, y por ejemplo, en Alemania se ha demostrado que la mezcla de dosis subletales de este microorganismo con preparados de virus de la polihedrosis nuclear incrementa significativamente la eficacia de los preparados víricos en el control de *Lymantria monacha* (Schönherr y Ketterer, 1979). El empeño en mejorar la efectividad en campo de los preparados de *Bacillus thuringiensis* frente a este insecto y explorar sus posibilidades de control se ha extendido también al estudio del efecto de la dieta (tipo de pino infestado) sobre la mortalidad inducida por este patógeno microbiano (Pérez-Guerra, 1995). Además, los estudios de toxicidad con nuevas cepas con distinta capacidad insecticida o con toxinas recombinantes podrían ser muy útiles también para lograr incrementar el efecto tóxico de las formulaciones comerciales. Las posibilidades biotecnológicas de las ICPs de *Bacillus thuringiensis*, junto con la mejora sistemática de la tecnología de aplicación prometen grandes avances en la utilización de este bioinsecticida, incluso en el control de insectos, como *Lymantria monacha*, en los que las limitaciones iniciales impuestas por su rango de toxicidad parecían augurar pocas perspectivas a este insecticida biológico.



## **VI CONCLUSIONES**

---

---



Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

1. Las ICPs de *Bacillus thuringiensis* causan una elevada mortalidad frente a *Thaumetopoea pityocampa*, por lo que las formulaciones basadas en esta patógeno microbiano pueden procurar un control efectivo de la plaga. En el caso de *Lymantria monacha*, sin embargo, la toxicidad de las ICPs es relativamente baja, por lo que la utilización de este insecticida biológico para el control de este insecto sería más indicada dentro de programas de manejo integrado de plagas, en los que la aplicación de preparados comerciales de *Bacillus thuringiensis* se combine con otros agentes de control.
2. La toxicidad en *Thaumetopoea pityocampa* de los productos comerciales basados en *Bacillus thuringiensis*, utilizados en este trabajo, está determinada por la toxicidad de la ICP en la que se encuentra enriquecido el formulado.
3. La toxicidad de las ICPs disminuye a medida que aumenta el estadio del desarrollo de las larvas tratadas. Esta pérdida de actividad es particularmente notable en el caso de Cry1Ab.
4. En *Thaumetopoea pityocampa* se ha demostrado la existencia de sitios de unión específica a la membrana del epitelio intestinal para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B. En las toxinas del tipo Cry1A, se han determinado los parámetros de unión en larvas de primeros y últimos estadios del desarrollo, demostrándose que, en larvas de primeros estadios, todas comparten un sitio de unión común. En este momento temprano del desarrollo, Cry1Ab presenta un sitio adicional al que se no se detecta unión en larvas de estadios superiores.
5. En *Lymantria monacha* se ha demostrado la existencia de sitios de unión específica a la membrana del epitelio intestinal para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en larvas de primeros estadios. En larvas de últimos estadios, sin embargo, sólo se detectó unión de Cry1Aa y Cry1Ac, determinándose los parámetros de unión de las mismas.
6. La pérdida de sitios de unión para Cry1Ab en la membrana intestinal de larvas de últimos estadios de *Thaumetopoea pityocampa* y *Lymantria monacha* se correlaciona con la disminución de toxicidad detectada para estos insectos en este momento del desarrollo.



## VII BIBLIOGRAFÍA

---





- Adang, M.J. (1991). *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: Gene structure, action, and visualization. En: **Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors**. (Editado por K. Maramorosch), pp. 3.24. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Adang, M.J. y K.D. Spence (1982). Biochemical comparisons of the peritrophic membranes of the lepidopterans *Orygia pseudotsugata* and *Manduca sexta*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 73B, 645-649.
- Altenkirsch, W., J. Huber y A. Krieg (1986). Versuche zur biologischen Bekämpfung der Nonne (*Lymantria monacha* L.). **PflKrankh.**, 93 (5), 479-493.
- Aronson, A. I., E. S. Han, W. McGaughey y 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.
- Ballester, V., B. Escriche, J.L. Ménsua, G.W. Riethmacher y J. Ferré (1994). Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to CryIA(b). **Biocontrol Sci. Technol.**, 4, 437-443.
- Bauer, L y H.S. Pankratz (1992). Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. **J. Invertebr. Pathol.**, 60, 15-25.
- Bauer, L. S. (1990). Response of the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego*. **Environ. Entomol.**, 19, 428-431.
- Beegle, C. C., T. L. Couch, R. T. Alls, P. L. Versoi y B. L. Lee (1986). Standardisation of HD-1-S-1980: U. S. Standard for assay of lepidopterous-active *Bacillus thuringiensis*. **Bull. Entomol. Soc. Am.**, 10, 400-401.
- Bejer, B. (1986). Outbreaks of Nun Moth (*Lymantria monacha* L.) in Denmark with remarks on their control. **Anz. Schädlingskd. Pflanz. Umweltschutz**, 59, 86-89.
- Belfiore, C., R.K. Vadlamudi, Y.A. Osman y L.A. Bulla Jr. (1994). A specific protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 200(1), 359-364.

- Borisova, S., P. Crochulki, H. Van Faassen, M. Pusztai-Carey, L. Masson y M. Cygler (1994). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the lepidopteran-specific insecticidal crystal protein CryIA(a). *J. Mol. Biol.*, 243, 530-532.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bradley, D., M. A. Harkey, M. K. Kim, K. D. Biever y L. S. Bauer (1995). The insecticidal Cry1B crystal protein of *Bacillus thuringiensis* supsp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and dipteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 65, 162-173.
- Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens y M. Peferoen (1992a). Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invert. Pathol.*, 60, 247-253.
- Bravo, A., S. Jansens y M. Peferoen (1992b). Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invert. Pathol.*, 60, 237-246.
- Burg, M. B. (1972). Perfusion of isolated renal tubules. *Yale J. Biol. Med.*, 45, 321-326.
- Cannon, R. (1993). Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.*, 37, 331-335.
- Carlson, C. R. y A. B. Kolstö (1993). A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J. Bacteriol.*, 175, 1053-1060.
- Carlton, B.C. y C. Gawron-Burke (1993). Genetic improvement of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide development. En: **Advanced engineered pesticides**. (Editado por L. Kim), pp. 3-42. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Carroll, J., J. Li y D.J. Ellar (1989). Proteolytic processing of a coleopteran-specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J.* 261, 99-105.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, D. Lereclus, J. Baum, J. Van Rie y D. H. Dean (1997). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin

nomenclature. WWW site: [http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)

- Crickmore, N., E.J. Bone, J.A. Williams y D.J. Ellar (1995). Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **131**, 249-254.
- de León, T. y J. E. Ibarra (1995). Alternative bioassay technique to measure activity of CryIII proteins of *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ. Entomol.**, **88**, 1596-1601.
- Denolf, P. (1997). Identification, cloning and characterization of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin receptors in lepidoptera. Tesis doctoral. Facultaeit Landbouwkundige en Togearte Biologische Wetenschappen. Universiteit Gent.
- Denolf, P., Kendrickx, J. Seurinck, J. Vandamme, S. Jansens, M. Peferoen y J. Van Rie (1997). Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. **Eur. J. Biochem.**, en prensa.
- Denolf, P., S. Jansens, J. Van Rie, D. Degheele y M. Peferoen (1993b). Biotinilation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**, 1821-1827.
- Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele y J. Van Rie (1993a). Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins receptors in the midgut brush border membrane of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera:Pyralidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**, 1828-1837.
- Dijkstra, S., E. Lohrmann, P. Steels y R. Greger (1994). Electrical properties of the isolated, *in vitro* perfused Malpighian tubule of the ant, the Cl<sup>-</sup> pathway. **Cell Physiol. Biochem.**, **4**, 19-30.
- Dow, J.A.T. (1984). Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. **Am. J. Physiol.**, **246**, 633-635.
- Dow, J.A.T. (1986). Insect midgut function. **Adv. Insect Physiol.**, **19**, 187-238.
- Dreistadt, S. H. y D. L. Dahlsten (1989). Gypst moth eradication in Pacific coast states: history and evaluation. **Bull. Entomol. Soc. Am.**, **35**, 13-19.

- Dulmage, H. T. (1975). Standardization of formulations of the  $\delta$ -endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.**, **25**, 279-281.
- Endo, Y. y J. Nishiitsutsuji-Uwo (1980). Mode of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. **J. Invertebr. Pathol.**, **36**, 90-103.
- Escriche, B., A.C. Martínez-Ramírez, M.D. Real, F.J. Silva y J. Ferré (1994). Occurrence of three different binding sites for *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins in the midgut brush border membrane of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, **26**, 315-327.
- Escriche, B., F.J. Silva y J. Ferré (1995a). Testing suitability of brush border membrane vesicles prepared from whole larvae from small insects for binding studies with *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal protein. **J. Invertebr. Pathol.**, **65**, 318-320.
- Estada, U. y J. Ferré (1994). Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Tricoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**, 3840-3846.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig y M. G. Koziel (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**, 5389-5394.
- Farrar, R. R. jr. y R. L. Rigdway (1995). Feeding behaviour of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae on artificial diet containing *Bacillus thuringiensis*. **Environ. Entomol.**, **24**, 755-761.
- Feitelson, J.S. (1993). The *Bacillus thuringiensis* family tree. En: **Advanced engineered pesticides**. (Editado por L. Kim), pp. 63-41. Marcel Dekkar, Inc. New York, USA.
- Feitelson, J.S., J. Payne y L. Kim (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. **Bio/Technology**, **10**, 271-275.
- Feldmann, F., A. Dulleman y C. Waalwijk (1995). Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**(7), 2601-2605.

- Ferré, J., M.D. Real, J. Van Rie, S. Jansens y M. Peferoen (1991). 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. USA*, **88**, 5119-5123.
- Ferro, D. N. Y S. M. Lyon (1991). Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larval mortality: Operative effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *J. Econ. Entomol.*, **84**, 806-809.
- Finney, D.J. (1962). Probit analysis. pp. 50-80. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Francis, B. R. y L. A. Bulla (1997). Further characterization of BT-R<sub>1</sub>, the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **27**, 541-550.
- Garczynski, S. F. Y M. J. Adang (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **25**, 409-415.
- Garczynski, S.F., J.W. Crim y M.J. Adang (1991). Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2816-2820.
- Georghiou, G. P. y A. Lagunes (1988). The occurrence of resistance to pesticides: cases of resistance reported worldwide through 1988. *F. A. O.*, Roma, pp. 235.
- Gill, S. S., E. A. Cowles y P.V. Pietrantonio (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.*, **37**, 615-636.
- Gill, S., E. Cowles y V. Francis (1995). Identification, isolation and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20309-20315.
- Glowacka-Pilot, B. (19869. Krankheitsserregende Mikroorganismen der Nonne (*Lymantria monacha* L.) und ihre Anwendung im Forstschutz. *PflKrankh.*, **93** (5), 494-502.

- González J. M. jr., H. T. Dulmage y B. C. Carlton (1981). Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, **5**, 351-365.
- González, J. M., B. J. Brown y B. C. Carlton (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for  $\delta$ -endotoxins among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6951-6955.
- Gould, F., A.C. Martínez-Ramírez, A. Anderson, J. Ferré, F.J. Silva y W.J. Moar (1992). Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7986-7990.
- Greger, R. y W. Hampel (1981). A modified system for *in vitro* perfusion of isolated renal tubules. *Pflügers Archiv*, **389**, 175-176.
- Grijpma, P., J. J. M. Belde y D. C. van der Werf (1987). Artificial diets and rearing of the nun moth, *Lymantria monacha*. *Entomol. Exp. Appl.*, **45**, 219-225.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borosova, M. Pusztai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brosseau y M. Cygler (1995). *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mo. Biol.*, **254**, 447-464.
- Grochulski, P., S. Borisova, M. Pusztai-Carey, L. Masson y M. Cygler (1994). 3-D crystal structure of lepidopteran specific  $\delta$ -endotoxin CryIA(a). **Proceedings of 2nd international conference on *Bacillus thuringiensis***. Montpellier, Francia.
- Gruppe, A. (1993). Die Bedeutung von Nadelinhaltsstoffen für den Entwicklungserfolg von Nonnen-Larven (*Lymantria monacha* L.). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.*, **8**, 497-498.
- Haider, M.Z., B.H. Knowles y D.J. Ellar (1986). Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal protein is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.*, **156**, 531-540.
- Hama, H., K. Suzuki y H. Tanaka (1992). Inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* formulations of the diamondback moth *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **27**, 355-362.

- Heimpel, A.M. y T.A. Angus (1959). The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. **J. Insect Pathol.**, **1**, 152-170.
- Hendrickx, K. (1992). Onderzoek naar de werkingwijze van het CryIA(b) delta-endotoxine van *Bacillus thuringiensis* in de middendarm van *Manduca sexta* (Insecta: Lepidoptera). Tesis Doctoral.
- Hodgman, T.C. y D.J. Ellar (1990). Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins determined by computational analysis. **J. DNA Sequ. Map.**, **1**, 97-109
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansen y H. Van Mellaert (1988b). 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., USA**, **85**, 7844-7848.
- Hofmann, C., P. Lüthy, R. Hütter y V. Pliska (1988a). Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Eur. J. Biochem.**, **173**, 85-91.
- Höfte, H. y H.R. Whiteley (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, **53**, 242-252.
- Höfte, H., H. De Greve, J. Seminck, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. Vanderbruggen, H. Van Montagu, M. Zabeau y M. Vaeck (1986). Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis berliner* 1715. **Eur. J. Biochem.**, **161**, 273-280.
- Honée, G. y B. Visser (1993). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Entomologia experimentalis et applicata**, **69**, 145-155.
- Ihara, H., E. Kuroda, A. Wadano y M. Himeno (1993). Specific toxicity of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. **Biosc. Biotech. Biochem.**, **57**, 200-204.
- Indrasith, L.S. y H. Hori (1992). Isolation and partial characterization of binding proteins from immobilized delta-endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombix mori*, and the common cutworm, *Spodoptera littura*. **Biochem. Physiol.**, **102B(3)**, 605-610.
- Jaques, R. P. y O. N. Morris (1981). Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. En: **Microbial control of pests**



- and plant diseases 1970-1980. (ed. H. D. Burges) pp. 695-715. Academic Press. New York.
- Jaquet, F., R. Hütter y P. Lüthy (1987). Specificity of *Bacillus thuringiensis* ••-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 500-504.
- Jensen, T. S. (1991). Integrated pest management of the nun moth, *Lymantria monacha* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Denmark. *Forest Ecology and Management*, **39**, 29-34.
- Klier, A., F. Fargette, J. Ribier y G. Rapoport (1982). Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain *berliner* 1715. *EMBO Journal*, **1**, 791-799.
- Knight, P. (1995). The biochemistry and molecular biology of insecticidal proteins and their cellular receptors. Tesis Doctoral. Darwin College. University of Cambridge, U.K.
- Knight, P., B. Knowles y D. Ellar (1995). Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. *J. Biol Chem.*, **270**, 17765-17770.
- Knight, P., N. Crickmore y D.J. Ellar (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.*, **11**(3), 429-463.
- Knowles B.H. y D.J. Ellar (1987). Colloid osmotic lysis is a general feature of mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* •-endotoxin with different insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta*, **924**, 509-518.
- Knowles, B.H. y D.J. Ellar (1986). Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific •-endotoxin. *J. Cell Sci.*, **83**, 89-101.
- Knowles, B.H. y J.A.T. Dow (1993). The crystal •-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*, **15**(7), 469-476.
- Knowles, B.H., M.R. Blatt, M. Tester, J.M. Horsnell, J. Carroll y D.J. Ellar (1989). A cytolytic ••-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.*, **244**, 259-262.

- Knowles, B.H., P. Knight y D.J. Ellar (1991). N-acetylgalactosamine is part of the receptor insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **245**, 31-35.
- Krieg, A. (1971). Concerning alpha-exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 134-135.
- Kronstad, J. W., H. E. Schnepf y H. R. Whiteley (1983). Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Bacteriol.*, **160**, 95-102.
- Laemli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lecadet, M.M. y R. Dedonder (1967). Enzymatic hydrolysis of the crystal of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. 1. Preparation and fractionation of the lisates. *J. Invertebr. Pathol.*, **9**, 310-321.
- Lee, M. K., R. M. Aguda, M B. Cohen, F. L. Gould y D. Dean (1997). Determination of binding of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin receptors to rice stemborer midguts. *Appl. Environ. Microbio.*, **63**, 1453-1459.
- Lee, M. y J. Amstee (1995). Characterization of midgut exopeptidase activity from larval *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **25**, 63-71.
- Lee, M., R. Milne, A. Ge y D. Dean (1992). Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17954-17958.
- Lee, M., T. You, B. Young, J. Cotrill, A. Valaitis y D. Dean (1996). Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl. Env. Microbiol.*, **62**, 2845-2849.
- LeOra Software (1987) POLO-PC. LeOra Software, Berkeley, California.
- Lereclus, D., A. Delécluse y M. M. Lecadet (1993). Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. En: *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice* (eds. Entwistle, P.F., J. S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs), pp. 3-69. John Wiley , Chichester, England.

- Lereclus, D., C. Bourgoïn, M.M. Lecadet, A. Klier y G. Rapoport (1989). Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. En: **Regulation of Prokaryotic Development** (Editado por I. Smith, R.A. Slepecky y P. Setlow), pp. 255-276. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Leyssens A., P. Steels, E. Lohrmann, R. Weltens y E. Van Kerkhove (1992). Intrinsic regulation of  $K^+$  transport in Malpighian tubules (*formica*): electrophysiological evidence. **J. Insect Physiol.**, **38**, 431-446.
- Li, J., J. Carroll y D.J. Ellar (1991). Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, **535**, 815-821.
- Liang, Y., S: Patel y D. Dean (1995). Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ -endotoxins to Gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **J. Biol. Chem.**, **270**, 24719-24724.
- Liu, Y. B. , B. E. Tabashnik y M. Puzsai-Carey (1996). Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.**, **89**, 798-804.
- Liu, Y. B. y B. E. Tabashnik (1997). Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**, 2218-2223.
- Luo, K., L. Yang-Giang y M. J. Adang (1996). A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, **26**, 783-791.
- Lüthy, P. y H.R. Ebersold (1981). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: histopathology and molecular mode of action. En: **Pathogenesis of invertebrate microbial disease** (Editado por E.W. Davidson), pp.235-267. Allanheld, Osmund & Co. Inc., Totowa, New Jersey, USA.
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, R.S. Jockerst y 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.
- Marrone, P.G. y S.C. MacIntosh (1993). Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management. En: ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice**, (Editado por P. Entwistle, J.S. Cory,

- M.J. Bailey y S. Higgs), pp. 221-235. John Wiley & sons Ltd., Chinchester, England.
- Martínez-Ramírez, A.C., B. Escriche, M.D. Real, F.J. Silva y J. Ferré (1995). Inheritance of resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a field population of diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Pestic. Sci.*, **43**, 115-120.
- Martínez-Ramírez, A.C., S. González-Nebauer, B. Escriche y M.D. Real (1994). Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **201**, 782-787.
- McGaughey, H.W. y R.W. Beeman (1988). Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, **81**, 28-33.
- McGaughey, W. H. y D. E. Johnson (1992). Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) resistance to different strains and mixtures of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econom. Entomol.*, **85**, 1594-1600.
- McGaughey, W.H. (1985a). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, **229**, 193-195.
- McGaughey, W.H. (1985b). Evaluation of *Bacillus thuringiensis* for controlling Indian meal moths (Lepidoptera: Pyralidae) in farm grains bins and elevator silos. *J. Econ. Entomol.*, **78**, 1089-1094.
- Mohamed, A. I., S. Y. Young y W. C. Yearian (1983). Susceptibility of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to microbial agent-chemical pesticide mixtures on cotton foliage. *Env. Entomol.*, **12**, 1403-1405.
- Mohammed, S. I., D. E. Johnson y A. I. Aronson (1996). Altered binding of the Cry1Ac toxin to larval membranes but not to the toxin-binding protein in *Plodia interpunctella* selected for resistance to different *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4168-4173.
- Mundson, P.J. y D. Rodbard (1980). LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding system. *Anal. Biochem.*, **107**, 220-239.
- Navon, A. (1993). Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and

- practice. (eds. Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs). pp. 125-146. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Niccoli, A. y R. Tiberi (1985). Impiego di *Bacillus thuringiensis* berliner nel controllo di insetti dannosi in ambienti agrari e forestali. **Estratto da REDIA, LXVIII**, 305-322.
- Oddou, P. H. Hartmann, F. Radcke y M. Geiser (1993). Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIA(b)  $\delta$ -endotoxin. **Eur. J. Biochem.**, **212**, 145-150.
- Oddou, P., H. Hartmann y M. Geiser (1991). Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. **Eur. J. Biochem.**, **202**, 673-680.
- Oppert, B., K.J. Kramer, D.E. Johnson, S.C. MacIntosh y W.H. McGaughey (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **198**, 940-947.
- Pérez, C. J. y A. M. Shelton (1997). Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* berliner in Central America. **Entomol. Soc. Am.**, **90**, 87-93.
- Pérez-Guerra, G. (1995). Einfluß der Nahrung auf die Empfindlichkeit von Nonnenlarven (*Lymantria monacha* Linné, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) gegenüber *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911). **Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.**, **10**, 147-150.
- Peyronnet, O., V. Vachon, R. Brousseau, D. Beines, J. L. Schwartz y R. Laprade (1997). Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**, 1679-1684.
- Piedrafita, A. C. (1996). Estudio de los mecanismos de toxicidad y adquisición de resistencia a  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en insectos plaga. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universitat de València.
- Plakidou-Dimock, S., M. Tanner y J. McGivan (1993). A role for aminopeptidase N in  $\text{Na}^+$ -dependent aminoacid transport in bovine renal brush border membrane. **Biochem. J.**, **290**, 59.

- Pree, D. J. y J. C. Daly (1996). Toxicity of mixtures of *Bacillus thuringiensis* with endosulfan and other insecticides to the cotton boll worm *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Sci.*, **48**, 199-204.
- Rahardja, U. y M.E. Whalon (1995). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* CryIII A •-endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, **88**(1), 21-26
- Ramachandran, R., K. F. Raffa, M. J. Miller, D. D. Ellis y B. H. McCown (1993). Behavioural responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) toxin in diet. *Environ. Entomol.*, **22**, 197-211.
- Ratcliffe, S. L. y Yendol, W. G. (1993). Lethal dose and associated effects of *Bacillus thuringiensis* in sprayed droplets against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Environ. Sci. Health*, **B28**(1), 91-104.
- Ravoahngmalala, O. y J. F. Charles (1995). *In vitro* binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae) *Febs Lett.*, **362**, 111-115.
- Reardon, R. C. y D. L. Wagner (1995). Impact of *Bacillus thuringiensis* on nontarget lepidopteran species in broad-leaved forests. En: **Biorrational Pest Control Agents**. (eds. Hall, F. R. y J. W. Barry). Pp. 284-292. ACS Symposium Series. Washington D.C., USA.
- Reddy, A., L. Battisti y C. B. Thorne (1987). Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. *J. Bacteriol.*, **169**, 5263-5270.
- Retnakaran, A., H. Lauzon y P. Fast (1983). *Bacillus thuringiensis* induced anorexia in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Entomologia experimentalis et applicata*, **34**, 233-239.
- Romanyk N. Y D. Cadahia (1992). En: **Plagas de insectos en las masas forestales españolas**. (eds. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA). pp. 37-47 Madrid
- Rossiter, M., W.G. Yendol y N.R. Dubois (1990). Resistance to *Bacillus thuringiensis* in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): Genetic and environmental causes. *J. Econ. Entomol.*, **83**(6), 2211-2218.

- Roush, R. T. (1989). Designing resistance management programs: how can you choose?. *Pestic. Sci.*, **26**, 423-441.
- Sacchi, F.V., P. Parenti, G.M. Hanozet, B. Giordana, P. Lüthy y M.G. Wolfersberger (1986). *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K<sup>+</sup> gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.*, **204**, 213-218.
- Salama, H. S., M. S. Foda, F. N. Zaki y S. Moawad (1984). Potency of combinations of *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticides on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, **77**, 885-890.
- Sambrook, T., E.F. Fritsch y T. Maniatis (1987). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. ColdSpring Harbor Laboratory Press.
- Sanchis, V. y D.J. Ellar (1993). Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\alpha$ -endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. *FEBS Lett.* **316**, 264-268.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux y M.-M. Lecadet (1988). Multiplicity of  $\alpha$ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *B. thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.*, **2**, 393-404.
- Sangalada, S., F.S. Walters, L.H. English y M.J. Adang (1994). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatases enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **269** (13), 10088-10092.
- Schnepf, H. E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. Zeigler y D. Dean (1997). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. En preparación.
- Schönherr, J. y R. Ketterer (1979). Zur Frage der kombinierten Anwendung von Polyedervirus und *Bacillus thuringiensis* bei der Nonne, *Lymantria monacha* L. (Lepidoptera). *PflKrankh.*, **86** (8), 483-488.
- Sebesta, K., J. Farkas, K. Horska y J. Vankova (1981). En: **Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980**. (de. Burgues, H. D.), pp. 249-282. Academic Press, London, U.K.
- Sims, S. B., J. T. Greenplate, T. B. Stone, M: A. Caprio y F: L. Gould (1996). Monitoring strategies for early detection of lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. En: **Molecular Genetics and**

- Evolution of Pesticide Resistance.** (ed. Brown, T. M.) pp. 229-242. ACS Symposium Series. Washington D. C. USA.
- Sims, S.R. y T.B. Stone (1991). Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **J. Invert. Pathol.**, **57**, 206-210.
- Slatin, S.L., C.K. Abrams y L. English (1990). Delta-endotoxins from cation-selective channels in planar lipid bilayers. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **169**, 765-772.
- Smith *et al.* (1995). Citado en Knight (1995).
- Soria, S., C. Herranz, F. Sánchez-Herrera y E. Obama (1988). Ensayo de eficacia con productos antiqunizantes, biológicos y piretroides contra *Lymantria monacha* (Linnaeus, 1758) (Lep. Lymantriidae), peligroso defoliador del *Pinus sylvestris* L. **Bol. San. Veg. Plagas**, **14**, 149-155.
- Spies, A. G. y K. D. Spence (1985). Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. **Tissue Cell**, **17**, 379-394.
- Stone, T.B., R.S. Sims, S.C. MacIntosh, R.L. Fuchs y P.G. Marrone (1991). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. En: **Biotechnology for biological control of pest and vectors**. (Editado por K. Maramorosch), pp. 53-66. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- Stone, T.B., R.S. Sims, y P.G. Marrone (1989). Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **J. Invert. Pathol.**, **53**, 228-234.
- Svestka, M. y J. Vankova (1980). Über die Wirkung von *Bacillus thuringiensis* in Kombination mit dem synthetischen Pyrethroid Ambusch auf *Operopthera brumata*, *Tortrix viridiana* und die Insektenfauna eines Eichenbestandes. **Anz. Schädlinge. Pflanz. Umweltschutz.**, **53**, 6-10.
- Tabashnik, B. E., N. Finson, F. R. Groeters, W. J. Moar, M. W. Johnson, K. Luo y M. Adang (1994). Reversal resistance to *Bacillus thuringiensis* en *Plutella xylostella*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**, 4120-4124.
- Tabashnik, B.E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol.**, **39**, 47-79.



- Tabashnik, B.E., J.M. Schwartz, N. Finson y M.W. Johnson (1992). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.**, 85, 1046-1055.
- Thurley, P., C.N. Chilcott, J. Kalmakoff y S.J. Pillai (1985). Characterization of proteolytic activity associated to *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* crystals. **FEMS Microbiol. Lett.**, 27, 221-225.
- Ticehurst, M., R. A. Fusco y E. M. Blumenthal (1982). Effects of reduced rates of Dipel 4L, Dylox 1.5 oil and Dimilin W-25 on *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae), parasitism and defoliation. **Env. Entomol.**, 11, 1058-1062.
- Tojo, A. y K. Aizawa (1983). Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* •-endotoxin by gut juice protease of the silkworm, *Bombix mori*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 45, 576-580.
- Tompkin, G. J., J. J. Linduska, J. M. Young y E. M. Dougherty (1986). Effectiveness of microbial and chemical insecticides for controlling cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) and imported cabbageworm (Lepidoptera: Pieridae) on collard in Maryland. **J. Econom. Entomol.**, 79, 497-501.
- Udenfriend, S. y K. Kodukula (1995). How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. **Annu. Rev. Biochem.**, 64, 563-591.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji y L. A. Bulla Jr. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **J. Biol. Chem.**, 270 (10), 5490-5494.
- Vadlamudi, R.K., T.H. Ji y L.A. Bulla Jr. (1993). A specific binding from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. **J. Biol. Chem.**, 268(17), 12334-12340.
- Valaitis, A.P., M.K. Lee, F. Rajamohan y D.H. Dean (1995). Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for CryIA(c) •-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 25(10), 1143-1151.
- Van Frankenhuyzen, K. (1990). Development and current status of *Bacillus thuringiensis* for control of defoliating forest insects. **Forestry Chronicle**, 56, 498-507.

- Van Frankenhuyzen, K. (1993). The challenge of *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. (eds. Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs). pp. 1-35. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Van Frankenhuyzen, K., J.L. Gringorten, R.E. Milne, D. Gauthier, M. Pusztai, B. Brosseau y L. Masson (1991). Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest lepidoptera. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(6), 1650-1655.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. Van Mellaert (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins: Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 239-247.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. Van Mellaert (1990a). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1378-1385.
- Van Rie, J., W.H. McGaughey, D.E. Johnson, B.D. Barnett y H. Van Mellaert (1990b). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, **247**, 72-74.
- Voller, A., D.E. Bidwell y A. Barlett (1976). Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. En: *Manual of clinical immunology*. (Editado por Rose, N.R. y H. Friedman), pp. 506-512. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
- Walters, F.S. y L.H. English (1995). Toxicity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **77**, 211-216.
- Webb, R. E., M. Saphiro, J. D. Podwaite, R. C. Reardon, K. M. Tatman, L. Venables y D. M. Kolodny-Hirsch (1989). Effect of aerial spraying with Dimilin, Dipel and Gypchek on two natural enemies of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Econ. Entomol.*, **82**, 1695-1701.
- Weseloh, R. M., T. G. Andreadis y R. E. B. Moore (1983). Field confirmation of a mechanism causing synergism between *Bacillus thuringiensis* and the

## Bibliografía

- gypsy moth parasitoid, *Apanteles melanosceles*. **J. Invert. Pathol.**, **41**, 99-103.
- Whalon, M.E., D.L. Miller, R.M. Hollingwoth, E.J. Grafius y J.R. Miller (1993). Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ. Entomol.**, **86**, 226-233.
- Wolfersberger, M.G. (1990). 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**, **46**, 475-477.
- Wolfersberger, M.G.P. Luthy, A. Maure, P. pareti, F.V. Sacchi, B. Giordana, y G.M. Hanozet (1987). Preparation and partial characterization of aminoacid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comp. Biochem. Physiol.**, **86**, 301-308.
- Wolfesberger, M., C. Hofmann y P. Lüthy (1986). Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. En: **Bacterial protein toxins**. (eds. Falmagne, P., J. Alouf, F. Fehrembach, J. Jeljaszewicz y M. Thelestam) pp. 237-238, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany.
- Yi, S., A. S. D. Pang y K. Van Frankenhuyzen (1996). Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* CryI toxins in the midguts of three forest insects and *Bombyx mori*. **Can. J. Microbiol.**, **42**, 634-641.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de  
D.ña. Carolina Rausell Segarra  
la calificación de Agto "cum laude"  
Valencia, a 19 de Diciembre de 1997

El Secretario,

El Presidente



*Abad*

*[Signature]*

Nº 503 del Registro de Facultades

