





BIOLOGICAS

481

T. D.

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departament de Genètica**



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

---

**RESISTENCIA A DELTA-ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*  
EN POBLACIONES NATURALES DE *Plutella xylostella*.**

Memoria presentada por  
D<sup>a</sup>. VICTORIA BALLESTER MARTÍNEZ  
para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas por la  
Universitat de València  
Valencia. Mayo de 1997

UMI Number: U603059

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 U603059

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

Biologicas

Nº Registre 10553  
DATA 25-9-97  
SIGNATURA T.D. 481  
Nº LEIB: j2088915X

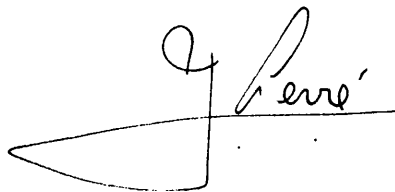
Dº. JOSE LUIS MÉNSUA FERNÁNDEZ y Dº JUAN FERRÉ  
MANZANERO, Profesores Titulares del Departamento de Genética de la  
Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

CERTIFICAN: Que Dª. VICTORIA BALLESTER MARTÍNEZ, licenciada en  
Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección el  
trabajo de investigación, recogido en esta memoria, que  
lleva por título: “**Resistencia a Delta-endotoxinas de  
*Bacillus thuringiensis* en poblaciones naturales de  
*Plutella xylostella*”**”, para optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente,  
expedimos el presente certificado en Burjassot a 29 de Mayo de 1997.



Fdo. Jose Luis Ménsua Fernandez



Fdo. Juan Ferré Manzanero

**Página**

<b>I.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.- Historia, biología y ecología de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	3
1.1.- Descubrimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> como insecticida.....	3
1.2.- Características insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> como alternativa a los insecticidas químicos.....	4
1.3.- Ecología de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	5
2.- Efecto insecticida de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	6
2.1. Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	6
2.2.- Clasificación.....	7
2.3.- Diversidad y actividad.....	9
3.- Caracterización molecular de las ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	10
3.1. Estructura primaria.....	10
3.2.- Estructura tridimensional.....	12
3.3.- Relación estructura-función.....	14
3.4.- Toxinas quiméricas.....	15
4.- Modo de acción de las ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
4.1.- Solubilización del cristal y activación proteolítica.....	18
4.2.- Interacción entre las ICPs activas y el intestino del insecto.....	19
4.3.- Formación del poro y lisis celular.....	22
5.- Resistencia a insecticidas basados en <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
5.1.- Mecanismos de adquisición de resistencia en insectos.....	24
5.2.- Genética de la resistencia.....	25
5.3.- Resistencia frente a <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	26
5.3.1.- Mecanismos de resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	27
5.3.2.- Genética de la resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	31
5.3.3.- Resistencia cruzada.....	32
5.4.- Aparición de resistencia en insectos frente a <i>Bacillus thuringiensis</i> .	33
5.4.1. Procesos de selección en la naturaleza.....	33
5.4.2.- Procesos de selección en el laboratorio.....	34

5.5. Estabilidad de la resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	34
5.6.- Estrategias para evitar el desarrollo de las resistencias en plagas.....	35
6.- Descripción y características biológicas del insecto <i>Plutella xylostella</i> .....	36
7.- Mutagénesis.....	37
<b>II.- OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
1.- Material biológico.....	42
1.1.- Poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> .....	42
1.2.- Mantenimiento de <i>Plutella xylostella</i> en el laboratorio.....	42
1.3.- Compuestos biológicos.....	43
2.- Ensayos de toxicidad.....	44
2.1.- Ensayos sobre dieta artificial.....	44
2.2.- Ensayos sobre hojas de col.....	44
3.- Selección artificial para la resistencia a ICPs.....	45
3.1.- Selección con ICPs puras.....	45
3.2.- Selección con MYX-03604.....	46
3.3.- Estima de la heredabilidad conseguida.....	46
4.- Mutagénesis.....	47
4.1.- Agente mutágeno.....	47
4.2.- Técnica de administración del mutágeno.....	47
5.- Análisis del tipo de herencia de la resistencia de <i>Plutella xylostella</i> frente a <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	48
6.- Purificación de ICPs.....	49
6.1.1.- Solubilización.....	49
6.1.2.- Activación.....	49
6.1.3.-Separación cromatografica.....	50
7.- Cuantificación de proteínas.....	53
8.- Electroforesis de proteínas.....	53
9.- Preparación de BBMV's.....	54



10.- Marcaje de Cry1Ab y Cry1Ac con Na <sup>125</sup> I.....	54
11.- Determinación de la actividad específica de <sup>125</sup> I-ICP.....	57
12.-Ensayos de unión <sup>125</sup> I-ICP-receptor.....	58
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
1.- Toxicidad de las ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a <i>Plutella xylostella</i> .....	60
1.1.-Toxicidad de las ICPs purificadas .....	60
1.2.-Toxicidad de los preparados comerciales de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	61
2.- Evaluación de la capacidad de <i>Plutella xylostella</i> para desarrollar resistencia frente a ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	63
2.1.- Selección frente a Cry1Ab en la subpoblación R1.....	64
2.2.- Selección frente a Cry1B en la subpoblación R1.....	66
2.3.- Evaluación de resistencias cruzadas entre las familias Cry1A y Cry1B en la subpoblación R1.....	69
2.3.1.- Evaluación de resistencia cruzada para Cry1Ba en la línea seleccionada con Cry1Ab.....	69
2.3.2.- Evaluación de resistencia cruzada para Cry1Ab en la línea seleccionada con Cry1Ba.....	69
2.4.- Selección frente a Cry1Ab en la subpoblación R2.....	71
2.5.- Selección frente a Myx-03604 en la subpoblación R2.....	73
2.6.- Evaluación de resistencia cruzada para las Cry1A's en las líneas seleccionadas con Cry1Ab y Myx-03604.....	76
2.7.- Estima de la heredabilidad del carácter responsable de la resistencia.....	79
2.7.1.- Heredabilidad del carácter responsable de la resistencia a Cry1Ab.....	80
2.7.2.- Heredabilidad del carácter responsable de la resistencia a Cry1Ba.....	80

2.7.3.- Heredabilidad del carácter responsable de la resistencia a Myx-03604. ....	80
3.- Análisis de la base genética de la resistencia en <i>Plutella xylostella</i> frente a <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	81
4.- Modelo de receptores en <i>Plutella xylostella</i> .....	83
5.- Determinación de la efectividad de toxinas quiméricas frente a <i>Plutella</i> <i>xylostella</i> .....	88
<b>V.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
1.- Toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> frente a <i>Plutella xylostella</i> .....	93
2.- Resistencia en <i>Plutella xylostella</i> frente a ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	95
3.- Determinación del modo de herencia de la resistencia a las ICPs del grupo Cry1A en <i>Plutella xylostella</i> .....	98
4.- Sitios de unión para las proteínas del grupo Cry1A de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el intestino de <i>Plutella xylostella</i> .....	107
5.- Importancia de los diferentes dominios presentes en las ICPs de <i>Bacillus thuringiensis</i> en la determinación de la toxicidad.....	110
<b>VI.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>120</b>

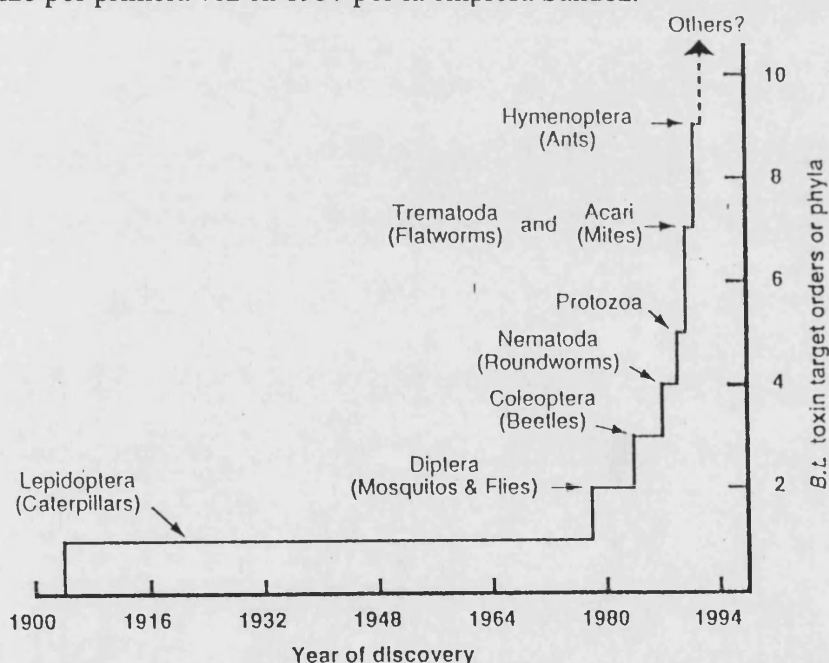
## INTRODUCCIÓN

## 1.- HISTORIA, BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE *BACILLUS THURINGIENSIS*.

### 1.1.- Descubrimiento de *B. thuringiensis* como insecticida.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva, perteneciente a la familia Bacillaceae y ubicua del suelo, que se caracteriza por su capacidad de producir un cristal proteico en el momento de la esporulación. El cristal, compuesto por una o más proteínas cristalinas con capacidad insecticida (ICP) o  $\delta$ -endotoxina, es el principal responsable de la actividad insecticida de *B. thuringiensis*.

El descubrimiento de *B. thuringiensis* se realizó a principios de este siglo por el investigador japonés Isawata, al aislar un bacilo de un gusano de seda enfermo. Pero su clasificación la realizó Berliner en 1915, tras un segundo aislado de una larva enferma de *Anagasta kuehniella*. Thuricide fue el primer producto derivado de *B. thuringiensis* y se comercializó por primera vez en 1957 por la empresa Sandoz.



**Fig 1. Representación del incremento en el descubrimiento Ordenes o Fila del número de especies sensibles a *B. thuringiensis* a lo largo del tiempo. (Feitelson *et al.*, 1993)**

La utilización comercial de la bacteria como insecticida ha llevado a muchos grupos de investigación a buscar nuevas cepas de *B. thuringiensis*, encontrándose nuevas actividades biológicas contra nuevos órdenes de insectos como Hymenoptera o Homoptera. Mycogen, Ecogen y Plant Genetic Systems son algunas de las organizaciones que poseen mayor número de cepas en sus colecciones.

Pero no sólo se ha encontrado actividad de *B. thuringiensis* frente a distintos órdenes de insectos, sino que también se ha visto efectividad contra otros organismos de los órdenes Nematoda (nemátodos parásitos de plantas y animales), Trematoda (parásitos del hígado de animales), así como contra ácaros y algunos protozoos patógenos (Feitelson, 1993). Es pues una necesidad conocer bien la interacción de los productos derivados de *B. thuringiensis* frente a diferentes órdenes animales antes de su utilización como bioinsecticidas.

## **1.2.- Características insecticidas de *Bacillus thuringiensis*: una alternativa a los insecticidas químicos.**

A pesar de que la utilización de microorganismos patógenos en el control de plagas no era una idea nueva, fue la aparición de plagas resistentes a los insecticidas químicos lo que replanteó esta primera opción. Los insecticidas químicos se han caracterizado principalmente por su alta patogeneidad y su capacidad acumularse y persistir en el medio ambiente, lo que provocaba la eliminación tanto de los insectos plaga como de los insectos beneficiosos. Además, el hecho de que el insecticida permaneciera durante bastante tiempo en el medio, producía grandes problemas ecológicos y medioambientales.

Sin embargo, *B. thuringiensis* presenta una serie de características que difieren de los pesticidas químicos y que deben ser tomadas en cuenta a la hora de su utilización. Éstas son:

a) Su existencia natural. Es decir, su utilización no supone añadir un compuesto artificial a un ecosistema de manera que pueda romper el equilibrio que éste presenta.

b) Su modo de acción. La activación de las  $\delta$ -endotoxinas debido al alto pH que presenta el intestino de los insectos provoca el desequilibrio osmótico y, como consecuencia, la muerte de las células intestinales.

c) Su especificidad. Un espectro muy reducido de toxicidad, según la cepa empleada, de modo que sólo actúa sobre unas pocas especies de insectos afectando poco o nada a especies de insectos beneficiosos, plantas o a humanos (Höfte y Whiteley, 1989; Lereclus, 1989; Adang, 1991, Green *et al.*, 1990; Jonhson y Tabashnik, 1993).

d) Su baja persistencia en el campo. Ello evita que se produzcan resistencias en los insectos plaga debido al poco tiempo de exposición al insecticida.

Estas características suponen una serie de ventajas frente a los insecticidas químicos ya que provocan un mínimo impacto ambiental. Pero al igual que ventajas, estas características también suponen unos inconvenientes ya que un insecticida con una elevada especificidad no resulta de gran utilidad en el caso de que un cultivo sea atacado por más de una especie a la vez. Por otro lado, si el insecticida perdura poco tiempo en el campo será necesario repetir los tratamientos con el gasto económico que esto supone para el agricultor. Aunque la pérdida de persistencia de actividad biológica de *B. thuringiensis* es el resultado de múltiples factores ambientales como altas temperaturas, pH del suelo, etc (Leong *et al.*, 1980), el rango de longitudes de onda entre 300-380 nm del espectro de la luz solar es mayoritariamente responsable de la pérdida de toxicidad en cristales purificados de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 y HD-73 (Pusztai *et al.*, 1991). De ahí que una solución a este problema pueda ser la adición de protectores de UV a los preparados comerciales (Morris *et al.*, 1983). También la utilización de técnicas de ingeniería genética ha mejorado el problema de su baja persistencia en el campo. En *Pseudomonas fluorescens* se han introducido genes de  $\delta$ -endotoxinas de modo que, una vez expresadas, permanecen protegidas del medio ambiente mediante una microcápsula biológica que es la pared de esta Gram-negativa (Gelernter, 1990). Pero el sistema más efectivo ha sido el de las plantas transgénicas. Se han introducido los genes de las  $\delta$ -endotoxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en plantas como el tabaco (Barton *et al.*, 1987; Vaek *et al.*, 1987), algodón (Perlak *et al.*, 1990), tomate (Fischhoff *et al.*, 1987; Perlak *et al.*, 1991); maíz (Koziel *et al.*, 1993), arroz (Fujimoto *et al.*, 1993) y patata (Peferoen *et al.*, 1990; Perlak *et al.*, 1991).

Respecto al limitado espectro de acción de los preparados de *B. thuringiensis*, se han producido cepas modificadas mediante conjugación entre diferentes cepas nativas (Calton *et al.*, 1990) e introducción de genes de  $\delta$ -endotoxinas a las cepas nativas (Crikmore *et al.*, 1990). Con esto se pretende que las cepas modificadas produzcan múltiples  $\delta$ -endotoxinas.

### 1.3. Ecología de *B. thuringiensis*.

En el ciclo de vida de *B. thuringiensis* se observan dos fases: una en la cual la célula vegetativa se divide, y otra en la que se produce la esporulación. Es precisamente en el momento de la esporulación cuando tiene lugar la producción de las  $\delta$ -endotoxinas.

El hecho de que la producción del cristal se produzca en periodos de escasez de alimentos o bajo situaciones de estrés fisiológico y que el cristal llegue a suponer el 35% del peso seco, hace suponer que la producción de cristales es una ventaja selectiva para la bacteria. Generalmente se acepta que la producción de  $\delta$ -endotoxinas permite a *B. thuringiensis* explotar un nicho ecológico, inaccesible para la mayoría de las bacterias productoras de esporas, como es el intestino de los insectos, ya que sin cristal *B. thuringiensis* no sería capaz de colonizar el intestino de los insectos, primero, por el alto pH (generalmente) del intestino y, segundo, por la rapidez con la que transita el alimento. Sin embargo, cuando una espora y su cristal son ingeridos por una larva de insecto susceptible, las  $\delta$ -endotoxinas provocan la paralización del intestino del insecto provocando la citólisis de la pared celular. Al mezclarse el contenido intestinal con la hemolinfa y descender el pH, se produce un cultivo rico en nutrientes en el que la espora puede germinar y crecer vegetativamente (Ellar *et al.*, 1990).

## **2.- EFECTO INSECTICIDA DE *BACILLUS THURINGIENSIS*.**

### **2.1.- Toxinas de *B. thuringiensis*.**

Las ICPs o  $\delta$ -endotoxinas producidas en el momento de la esporulación, son las principales responsables de la acción insecticida de *B. thuringiensis*. Se ha observado que las inclusiones cristalinas pueden ser de 4 tipos morfológicamente diferentes y éstos son: bipiramidales, cuboidales, romboides y ovoidales (Höfte y Whiteley, 1989). Estas morfologías se han podido relacionar con especificidad en la toxicidad de modo que, los cristales bipiramidales que son los que con mayor frecuencia aparece en los aislados, se muestran activos contra lepidópteros; los cristales cuboidales son activos contra lepidópteros y dípteros; los romboides contra especies de coleópteros y los ovoidales contra dípteros.

Pero el esporulado contiene una amplia variedad de metabolitos secundarios algunos de los cuales también presentan capacidad insecticida, como la  $\beta$ -exotoxina o thuringiensina (Sebesta *et al.*, 1981), un inmunoinhibidor (Siden *et al.*, 1979), fosfolipasas (Henner *et al.*, 1988) y una  $\alpha$ -exotoxina, la lecitinasa C (Dulmage, 1981). La  $\alpha$ -exotoxina es una proteína termosensible producida en la fase vegetativa, tanto de *B. thuringiensis*

como de *B.cereus*, que puede presentar actividad incluso frente a ratones y lepidópteros (Krieg, 1971). La  $\beta$ -exotoxina o thuringiensina es un derivado del adenosín monofosfato, que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas (Sebesta *et al.*, 1981). Los plásmidos responsables de la producción de  $\beta$ -exotoxina pueden contener uno o más genes que codifiquen para diferentes ICPs. (Levinson *et al.*, 1990)

Asociadas a las  $\delta$ -endotoxinas se encuentran las proteínas denominadas Cyt. Estas proteínas son de pequeño tamaño y presentan capacidad citolítica. Tanto en las  $\alpha$  y  $\beta$ -exotoxinas como en las proteínas Cyt, no se ha encontrado una especificidad por el huésped, por lo que se piensa que simplemente contribuyen a la toxicidad general de la cepa potenciando la acción de las proteínas específicas (Lereclus *et al.*, 1993).

## 2.2.- Clasificación.

*B. thuringiensis* está estrechamente relacionado con *B.cereus* y algunos autores consideran que deberían considerarse la misma especie (Angus, 1956; Priest *et al.*, 1988). En realidad, las cepas de *B. thuringiensis* acristalóforo son indistinguible de *B.cereus*, y la síntesis del cristal proteico es transmisible de una a otra especie mediante conjugación (Gonzalez *et al.*, 1982)

Las primeras clasificaciones efectuadas en la bacteria *B. thuringiensis* se realizaron con anterioridad al descubrimiento de su capacidad tóxica frente a insectos. Estas clasificaciones se basaron en la existencia de dos tipos de antígenos, flagelares (H) y somáticos (O), en la superficie de las células vegetativas de *B. thuringiensis*. Actualmente los antígenos flagelares son los más utilizados en la clasificación de cepas de *B. thuringiensis*. En base a ellos, se han identificado al menos 55 serotipos y 68 variedades de *B. thuringiensis* (Lecadet *et al.*, 1996). Sin embargo la clasificación basada en los serotipos no permite predecir su actividad insecticida. El descubrimiento de que los genes que codifican para las  $\delta$ -endotoxinas se encuentran en plásmidos que pueden ser transmitidos o asociados con elementos trasponibles (González *et al.*, 1982), permite comprender como serotipos que presentaban el mismo antígeno flagelar (H) puedan mostrar diferentes patogeneidades frente al mismo insecto.

El hecho de que el espectro de toxicidad de las variedades dependía de las  $\delta$ -endotoxinas (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 esas proteínas y en su especificidad de la 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, trece codificaban para proteínas Cry, y el último para la proteína citolítica CytA. Los 13 genes *cry* se dividen 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 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, codifica para una proteína de 27 kDa que presenta actividad citolítica contra células de vertebrados e invertebrados.

Aunque la clasificación de Höfte y Whiteley es útil, han ido apareciendo más casos en los que no se cumplen los supuestos bajo los que está realizada. Por ejemplo se ha descrito actividad tóxica de la toxina Cry1Ba frente a lepidópteros y coleópteros (Bradley *et al.*, 1995) a pesar de estar clasificadas en la categoría CryI

Crickmore *et al.*, (1995) han sugerido una nomenclatura revisada de los genes *cry* de *B. thuringiensis* basada únicamente en la identidad de la secuencia de aminoácidos. 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. La conversión de esos datos en un dendograma se realizó mediante el programa Neighbor. De las 18 grupos de secuencias similares nos encontramos 16 proteínas Cry (de Cry1 a Cry16) y 2 proteínas CytA (Cyt1 y Cyt2). En la figura 2 se muestran tres líneas verticales que representan más o menos el 46%, el 78% y el 96% del porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos, y que definen cuatro categorías. El grupo 1 (similitudes hasta el 46%) marca las diferencias entre las 18 proteínas tanto Cry como Cyt1A. El grupo 2 (diferencias de similitud del 46% al 78%) es el que define la primera letra (mayúscula) al nombrar las toxinas, mientras que el grupo 3 (diferencias de similitud del 78% al 96%) define la segunda letra (minúscula). El grupo 4 está compuesto por ICPs que difieren en menos de un 96%, es decir, alelos de un mismo gen.



aislados de *B. thuringiensis* le confiere la posibilidad de producir efectos sinérgicos entre las distintas toxinas. Ciertos genes *cry* presentan una estructura tipo transposón al estar flanqueados por dos conjuntos de repeticiones invertidas y alguno de ellos contienen además un elemento transponible. Así, la presencia del gen que codifica para Cry1Ab, en un gran número de cepas de *B. thuringiensis*, puede ser explicada si va acompañado por un transposón que le dota de movilidad y capacidad de inserción y duplicación.

La pérdida espontánea de plásmidos también podría explicar la generación de la gran diversidad encontrada en las poblaciones naturales de *B. thuringiensis* (Carlton y Gawron-Burke, 1993).

La actividad insecticida de una cepa de *B. thuringiensis* viene determinada por:

- el número de genes *cry* presentes
- diferencias cualitativas entre las secuencias de aminoácidos de las ICPs
- diferencias en los niveles de expresión de los genes
- las propiedades intrínsecas de las ICPs tales como estabilidad y actividad.

La correlación entre variedades de *B. thuringiensis* y los genotipos de las  $\delta$ -endotoxinas es bastante débil de modo que múltiples copias heterogéneas del gen de la protoxina pueden codificar proteínas de aproximadamente el mismo peso molecular (Lee y Aronson, 1991).

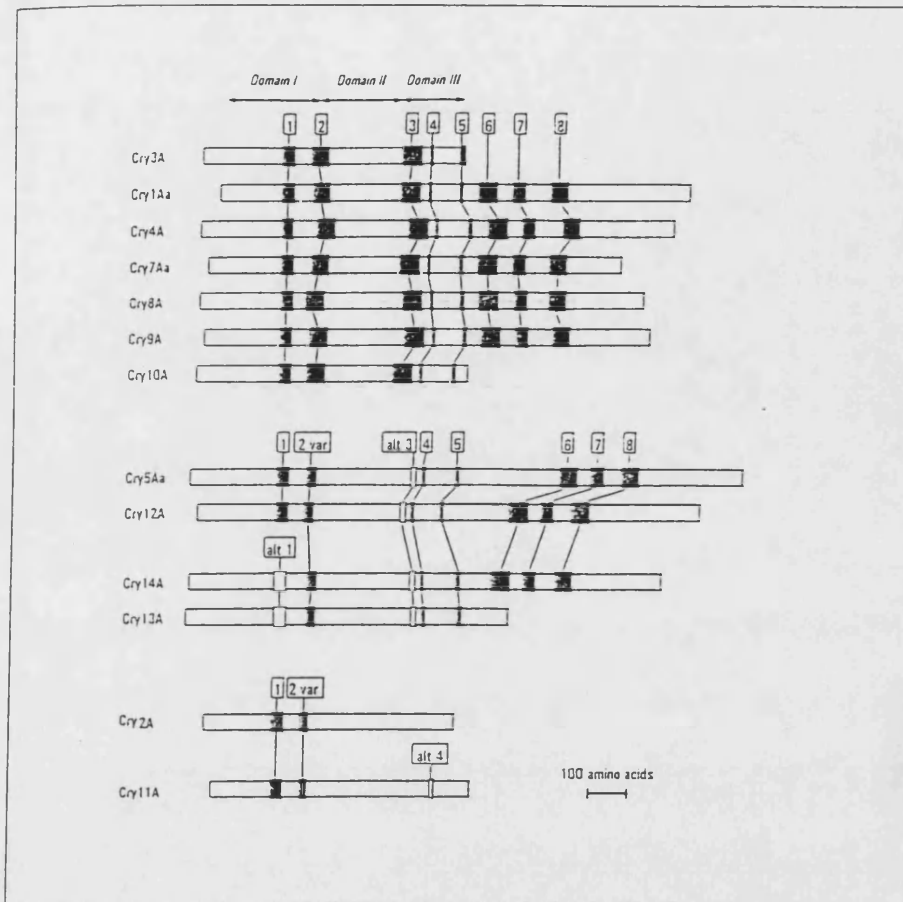
Las células de *B. thuringiensis* pueden contener 70 copias del mismo gen, aunque en la cepa salvaje los genes *cry* se han encontrado en grandes plásmidos con un número bajo de copias (Lereclus *et al.*, 1989; De Souza *et al.*, 1993). Así pues, el número de genes necesarios para la máxima expresión de una ICP dada parece ser considerablemente menor (entre 5 y 15 copias) (Arantes y Lereclus, 1991).

### **3.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ICPs DE *Bacillus thuringiensis*.**

#### **3.1. Estructura primaria.**

La secuenciación y la clonación de los genes que codifican para protoxinas de *B. thuringiensis*, ha revelado que las toxinas Cry pertenecen a una familia relativamente

próxima de proteínas con un rango de actividades insecticidas diferentes. Las protoxinas codificadas por estos genes presentan pesos moleculares comprendidos entre 50-140 kDa. Según el modelo estructural de una  $\delta$ -endotoxina activada realizado por Hodman y Ellar (1990), ésta constaría de dos extremos con características diferentes, el C-terminal con carácter hidrofílico y el N-terminal con carácter hidrofóbico. En la activación de las ICPs mediante proteasas del intestino medio de los insectos, los extremos C-terminal y N-terminal son eliminados y/o modificados. Las regiones de las toxinas responsables de la especificidad y/o la toxicidad, se estudiaron mediante el alineado de las secuencias de aminoácidos de diferentes toxinas, pudiendo así establecer áreas de similitud o divergencia. Mediante el alineado, Höfte y Whiteley (1989) identificaron cinco bloques con secuencias altamente conservadas, separadas entre sí por regiones con secuencias altamente variables y de diferentes tamaños dependiendo del tipo de proteína. Más tarde, y atendiendo a la presencia o ausencia de estos bloques, Schnepf *et al.* (1996) (Fig 3) distinguen tres grupos diferentes de proteínas Cry. Un primer grupo formado por las IPCs (Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10) que presentan los 5 bloques conservados y un segundo grupo formado por IPCs (Cry5, Cry12, Cry13, Cry14) que presenta conservados los bloques 1, 2, 4 y 5. En el segundo subgrupo existe un nuevo bloque conservado (alt 3) que no se encuentra en el primer subgrupo. Tanto el primer subgrupo como el segundo presentan tres nuevos bloques conservados llamados 6, 7 y 8. El tercer subgrupo lo forman las ICPs Cry2 y Cry11 que presentan únicamente el bloque conservado 1, además de una variante del bloque 2 (var 2) y un nuevo bloque conservado llamado alt 4. Las ICPs restantes, Cry6 y Cry15 no poseen homología con los bloques conservados. El hecho de que todas las ICPs, a excepción de Cry2 y Cry11, posean un tramo de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal ha llevado a pensar que es precisamente esta región la que juega un papel fundamental en la interacción de la ICP con el intestino medio de los insectos (Höfte y Whiteley, 1989). Como puede observarse, las ICP de *B. thuringiensis* presentan un alto grado de conservación de residuos internos, lo que implica que las proteínas homólogas adoptarán plegamientos similares.



**Fig 3. Representación esquemática de los bloques conservados en las diferentes proteínas Cry.** Schnepf *et al.* (1996). Las rectángulos “alt 1” y “alt 3” son posibles alternativas a los bloques 1 y 3 mientras que “var 2” es una variedad del bloque 2. Los rectángulos blancos son secuencias con baja o ninguna homología.

### 3.2.- Estructura tridimensional

Mediante difracción de rayos-X se han determinado las estructuras terciarias de los fragmentos activos de Cry3A, (Li *et al.*, 1991) y de Cry1Aa, (Grochulski *et al.*, 1995) (Fig ). Aunque Cry3A presenta actividad en el intestino ácido de los coleópteros y Cry1Aa en el intestino básico de los lepidópteros, se han encontrado similitudes en las estructuras de ambas ICPs. Cry3A y Cry1Aa, que comparten en su forma activada un 36% de los aminoácidos, presentan una estructura terciaria similar formada por tres dominios estructurales diferentes en los que se distinguen los mismos pliegues topográficos.

El dominio I es un agrupamiento de siete  $\alpha$ -hélices, seis de las cuales se disponen de forma hexagonal alrededor de una central ( $\alpha$ 5) que es hidrofóbica. Las hélices  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,

$\alpha 4$  y  $\alpha 6$  son relativamente hidrofílicas y se encuentran encaradas hacia el exterior mientras que las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 7$  son hidrofóbicas y se encuentran cerca del dominio II. A este dominio I se le ha atribuido la formación de poros en la membrana.

El dominio II está constituido por tres hojas  $\beta$  antiparalelas que forman una columna. Las dos primeras son altamente homólogas, mientras que la última contiene una pequeña  $\alpha$ -hélice que podría contribuir a dar la estabilidad a la estructura. En este dominio II se encuentran las secuencias más conservadas en todas las proteínas Cry (Höfte y Whiteley, 1989). Esto nos sugiere que este dominio es el responsable de la especificidad por el receptor.

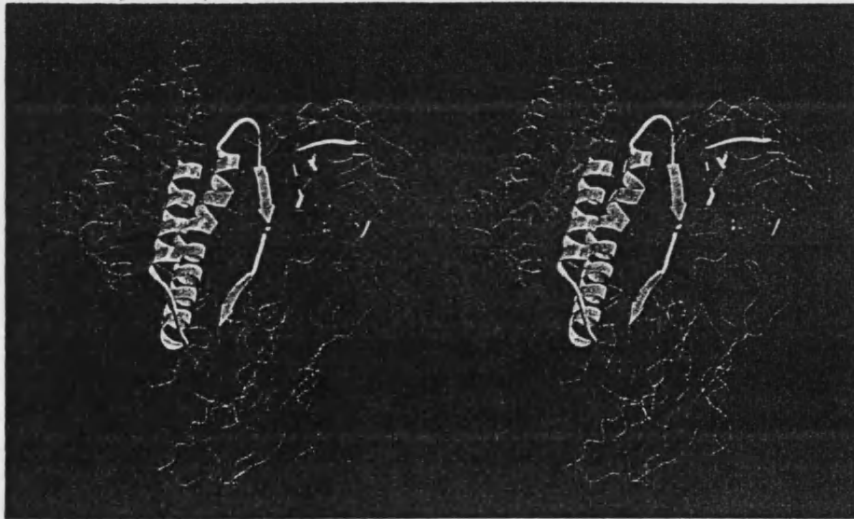
El dominio III muestra una estructura de varias cadenas  $\beta$ -antiparalelas. Estas cadenas contienen el extremo C-terminal, que está en contacto con el dominio I, llegando incluso a estar casi totalmente escondido en la molécula. La falta de acceso es, probablemente, la razón por la cual el extremo C-terminal de las toxinas Cry es resistente a la proteólisis (Li *et al.*, 1991). Al dominio III, junto al dominio II, se le ha atribuido la especificidad de la toxicidad de la ICP. La similitud de los aminoácidos entre Cry3A y Cry1Aa varía entre los tres dominios, encontrándose que las mayores similitudes se dan en los dominios I (35%) y III (41%), la menor similitud en el dominio II (23%) (Grochulski *et al.*, 1995). Tampoco la similitud estructural está uniformemente repartida a través de la molécula. De modo que, aunque los dominios estén asociados de modo similar entre Cry3A y Cry1Aa, existen diferencias en la posición relativa de los dominios en las dos moléculas. Estas diferencias podrían deberse a diferencias en las secuencias y a diferente empaquetamiento del cristal (en el dominio I), o diferencias en la posición y longitud de los bucles (en el dominio II). La alta similitud estructural del dominio III de las toxinas Cry3A y Cry1Aa sugiere que este dominio juega un papel importante en el comportamiento funcional de la toxina (Grochulski *et al.*, 1995).

Tras el estudio realizado a partir de las estructuras cristalinas es evidente que los 5 bloques de aminoácidos conservados compartidos por la mayoría de las ICPs se encuentran en los dominios de modo que, el bloque 1 corresponde a la hélice central ( $\alpha 5$ ) en el dominio I,

el bloque II coincide con la hélice  $\alpha 7$  y con el principio de la primera hoja- $\beta$  del dominio II y el dominio III incluye la última hoja- $\beta$  del dominio II y el segmento N-terminal de dominio III. Parte del bloque 3 junto con los bloques 4 y 5, constituyen las tres cadenas

antiparalelas del dominio III. El hecho de que los dos grupos de toxinas (Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10 y Cry5, Cry12, Cry13, Cry14) conserven 4 o 5 bloques de implica que ambas tengan una estructura terciaria similar a Cry13A y Cry1Aa. Cry2 y Cry11 podrían sólo compartir el dominio estructural I, mientras que Cry6, Cry15 y las proteínas Cyt presentarían un plegamiento totalmente diferente (Li et al., 1995).

Para la formación del cristal de las proteínas Cry3A y Cry1Aa se producen cuatro puentes salinos inter-catenarios entre el dominio I y el dominio III. Los residuos que forman estos puentes salinos se encuentran muy conservados en las proteínas Cry, por lo que se piensa que juegan un papel importante en el mantenimiento de la forma globular durante la solubilización y la activación de la protoxina en el intestino de los insectos, siendo los responsables de la insolubilidad general del cristal in vivo a pH no extremos.



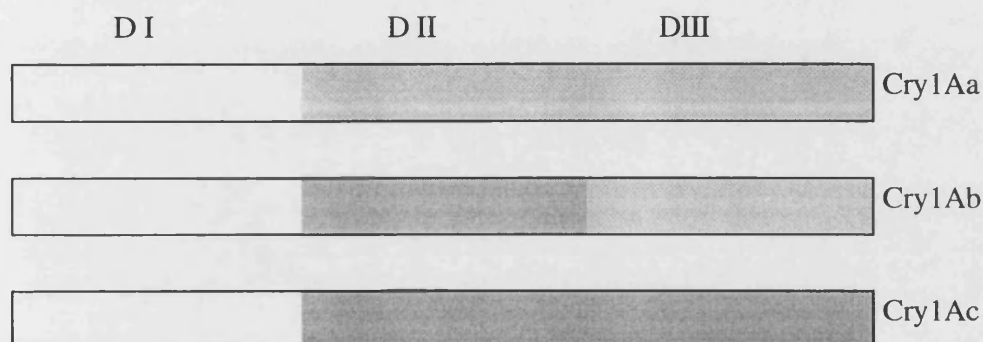
**Fig nº4. Estructura cristalográfica propuesta para la ICP Cry3A (Li et al 1991),y Cry1Aa (Girochulski et al., 1995).**

### **3.3).- Relación estructura-función.**

La comparación de los elementos estructurales (aminoácidos) de las toxinas y su acción nos permite estudiar la relación estructura-función. Podemos distinguir dos tipos de estudios estructura-función: mediante sustituciones o deleciones simples o múltiples de aminoácidos en proteínas individuales, o mediante la producción de proteínas quiméricas en las que una parte de la molécula es reemplazada por una región homóloga de otra.

Ambas aproximaciones se han aplicado en proteínas Cry experimentando *in vivo* mediante bioensayos o *in vitro* mediante ensayos de unión o de permeabilidad.

Es interesante observar como el gen de Cry1Ab es un híbrido natural entre Cry1Aa y Cry1Ac. La recombinación *in vivo* entre diferentes genes *Cry* podría explicar la aparición de nuevos genes codificantes para nuevas toxinas en la naturaleza (Geiser *et al.*, 1986) (fig 5). La producción de nuevos genes híbridos, tanto *in vivo* como *in vitro*, que codifican diferentes ICP tóxicas y que presentan por tanto características diferentes, nos abre un mayor abanico de posibilidades a la hora de controlar la aparición de resistencias frente a *B. thuringiensis* en el campo. Por otro lado, nos ofrece grandes posibilidades de estudio a la hora de relacionar capacidades tóxicas de las ICPs con los tres diferentes dominios que las componen o incluso con determinadas secuencias de aminoácidos.



**Fig 5.** La figura muestra como la secuencia de aminoácidos de Cry1Ab presenta mayor similitud con Cry1Aa en el dominio III y con Cry1Ac en el dominio II. Mientras que en el dominio I apenas se observan diferencias entre las tres toxinas.

### 3.4.- Toxinas quiméricas.

Mediante diferentes técnicas *in vitro* pueden producirse combinaciones de secuencias del ADN y obtener nuevos genes quiméricos. Posteriormente a la obtención *in vitro* de nuevos genes híbridos es necesario comprobar que éstos codifican para unas nuevas proteínas que presentan características similares a las proteínas naturales de *B. thuringiensis*. Estas características son:

- expresión de niveles suficientes de proteína
- producción de una proteína soluble a pH altos (generalmente el valor que presenta el intestino de los insectos) y sin formación de agregados



- la proteína producida una vez solubilizada debe ser tripsinizada correctamente. Es decir, no debe ser totalmente degradada, sino que debe tener protegido su fragmento activo contra la acción de las proteasas.

La prueba final y esencial para la evaluación de una nueva proteína quimérica es la comprobación de su capacidad tóxica frente a insectos diana ya que algunas de ellas, aún reuniendo las propiedades descritas anteriormente, se muestran biológicamente inactivas e incapaces de producir efecto tóxico frente a un insecto.

Se ha intentado obtener diferentes toxinas quiméricas entre las ICPs Cry1Ab y Cry1E utilizando métodos de manipulación de DNA recombinante, basándose en la estructura tridimensional de la Cry3A de tres dominios, para comprobar que secuencia era la responsable de la toxicidad dentro del dominio II. Pero el resultado fue unas proteínas quiméricas biológicamente inactivas que formaban agregados insolubles o que eran degradadas totalmente por la tripsina (Bosch *et al*, 1994a).

Mediante estudios de toxicidad se encontró, en la población resistente de *P. xylostella* procedente de Hawaii, resistencia cruzada entre las toxinas Cry1A, Cry1Fa y el híbrido H04 (con el dominio I y II de Cry1Ab y el III de Cry1C). Análisis de secuencias mostraron el alto grado de homología que presentaban estas proteínas teniendo en cuenta el dominio II. Sin embargo no ocurría lo mismo si se comparaban las secuencias de los dominios I y III. Así pues, el resultado de estos estudios implicaba que la resistencia, tanto a las Cry1As como a las otra tres toxinas, implicaba una alteración entre el insecto y el dominio II (Tabashnik *et al*, 1996).

Se han producido otros genes híbridos entre Cry1C y Cry1E mediante recombinación *in vivo* para descubrir a qué dominio de la ICP se le puede atribuir la capacidad tóxica. El análisis de los híbridos mostraba que, el caso de *Spodoptera exigua* y *Mamestra brassica*, la acción tóxica se le atribuía al dominio III ya que la toxina Cry1E que resultaba ser no tóxica para estos insectos, mostraba toxicidad después de introducirle el dominio III de la Cry1C (tóxica para *S.exigua* y *M.brassicae*) (Bosch *et al*, 1994b).

Estos dos ejemplos sugieren que el dominio III juega un papel esencial en la determinación de los niveles de toxicidad en los insectos diana.

Los estudios de unión realizados entre toxinas marcadas y BBMV de *S.exigua*, indicaban que la sustitución del dominio II no afectaba a la especificidad de la unión. Sin embargo la unión de Cry1Ab a una molécula de 200 kDa quedaba totalmente eliminada

cuando se producía una sustitución del dominio III, mientras que esa unión si se producía con un híbrido que presentaba el dominio III de Cry1Ab y el I y II de Cry1C. Este resultado confirma que el dominio III de la Cry1Ab era esencial para la unión específica mientras que la unión detectada en los dominio I y II era inespecífica (De Maagd *et al*, 1996b).

Utilizando toxinas tanto naturales como híbridos entre Cry1A y Cry1C, en *S.exigua* y *M.brassicae* se observó que, en los dos insectos, el dominio III era el responsable de la unión de Cry1Ac a una proteína de 210 kDa aunque, en *M.sexata*, Cry1Ac también se unía a una proteína de 210 kDa a través del dominio I y/o II. Por otro lado, en *S.exigua* y *M.brassicae*, Cry1Ab reconocía una molécula de 210 kDa a través del dominio II y otra proteína de 250 kDa a través del dominio III (De Maagd *et al*, 1996a).

Estos resultados muestran que tanto el dominio II como el III de las  $\delta$ -endotoxinas juegan un papel importante en la unión específica de estas toxinas a las proteínas de membrana del intestino medio de estos insectos, aunque para *S.exigua*, no esté clara la correlación entre la toxicidad *in vivo* y los resultados obtenidos mediante experimentos de unión *in vitro*.

#### 4.- MODO DE ACCIÓN DE LAS ICPs DE *B.t.*

Para que una  $\delta$ -endotoxina pueda ejercer su poder tóxico, es necesario que sea ingerida por una larva sensible de un insecto. El primer contacto, pues, entre la larva y la  $\delta$ -endotoxina, es a través del intestino.

El epitelio del intestino medio de los insectos, que presenta diferente morfología al intestino anterior y posterior, es el que manifiesta principalmente los efectos patológicos de las  $\delta$ -endotoxinas. Dicho intestino medio presenta un epitelio formado por una monocapa de células situado sobre una membrana basal. En el epitelio intestinal nos vamos a encontrar con tres tipos de células diferentes que son: Las células columnares, que tienen la función digestiva y de absorción, función que realizan mediante las microvellosidades; las células calciformes, implicadas en el transporte de iones y, finalmente, las regenerativas que son pequeñas y triangulares y se distribuyen entre las células columnares y las calciformes. Protegiendo al epitelio de posibles lesiones o infecciones, nos encontramos con una membrana llamada peritrófica que sólo permite el

paso a moléculas con un peso molecular inferior a 60kDa (Adang y Spence, 1982). Esta membrana peritrófica separa, pues, la membrana epitelial del intestino y el lumen.

Tras la ingestión de la  $\delta$ -endotoxina ocurren una serie de procesos que provocan cambios fisiológicos y, finalmente, la muerte del insecto (Heimpel y Angus, 1959). Estos cambios son: aumento de volumen de las células columnares acortándose a su vez las microvellosidades y quedando integradas prácticamente dentro de las células, vacuolización del citoplasma y desintegración gradual del retículo endoplasmático y mitocondrias. El resultado final, tras la rotura del equilibrio osmótico es la lisis celular y la destrucción del intestino (Endo y Nishiitsutsuji-uwo, 1980; Lüthy y Ebersold, 1981; Mathavan *et al.*, 1989; Bauer y Pankratz, 1992).

Las  $\delta$ -endotoxinas son sintetizadas en forma de protoxina insoluble en agua e inactiva, por tanto son necesarios una serie de procesos bioquímicos para ejercer su función. Los procesos necesarios se describen a continuación.

#### 4.1.- Solubilización del cristal y activación proteolítica

La solubilización de las  $\delta$ -endotoxinas tiene lugar en el interior del intestino de los insectos diana gracias a su fuerte alcalinidad, es decir, pH >9.5 (Dow, 1984). Sin embargo las ICP de tipo Cry3, específicas de coleópteros, sólo son solubles a valores de pH extremos, como a pH alcalinos (por encima de 10) como a pH ácidos (por debajo de 4) (Li *et al.*, 1991).

Posteriormente, se ha comprobado que la solubilización del cristal proteico se ve afectado tanto por la composición del cristal como por la composición del lumen del intestino del insecto (Jaquet *et al.*, 1987; Aronson *et al.*, 1995)

Una vez solubilizados los cristales, la  $\delta$ -endotoxina es activada por las proteasas del intestino del insecto o por las proteasas asociadas a los mismos cristales (Dow, 1986; Thurley *et al.*, 1985; Carroll *et al.*, 1989). Las serín-proteasas del intestino de los insectos diana 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 prácticamente la mitad N-terminal de la protoxina. Las proteínas Cry2, Cry3 y Cry4D de 70 kDa, se pueden considerar formas truncadas naturales de la mitad N-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa y no sufren proteólisis en su extremo C-terminal (Hodman y Ellar, 1990). Sin embargo, del

extremo N-terminal de Cry2A y Cry3A sí se eliminan algunos aminoácidos (Adang, 1991; Carrol y Ellar., 1989).

La proteólisis de las protoxinas puede ser realizada, en la mayoría de los casos, mediante extractos intestinales de diferentes insectos (Knowles y Ellar, 1986) o mediante proteasas comerciales purificadas, como la tripsina. Únicamente se conoce un caso en el que la activación proteolítica afecte a la especificidad insecticida de las  $\delta$ -endotoxinas y es en una cepa de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, tóxica para dípteros y lepidópteros. Cuando la activación de la protoxina se realiza mediante proteasas de lepidópteros, es activa contra especies de ambos órdenes de insectos, mientras que si la activación se realiza con jugo intestinal de dípteros, el fragmento resultante sólo es tóxico contra especies de este orden (Haider *et al.*, 1986).

#### 4.2.- Interacción entre las ICPs activas y el intestino del insecto.

Los procesos de solubilización y activación de las  $\delta$ -endotoxinas, pueden mostrarnos cierta especificidad entre la  $\delta$ -endotoxina y el insecto diana. Sin embargo, la mayor determinación de especificidad la manifiesta la unión de las toxinas a los “receptores” de membrana en las células intestinales de los insectos. Esta unión ha quedado demostrada *in vitro* (al menos con las toxinas Cry1) mediante experiencias de cinética de unión y estudios de competencia, usando toxinas marcadas radiactivamente con  $^{125}\text{I}$  y vesículas del borde en cepillo de la membrana epitelial del intestino medio de los insectos (BBMV) (Hofmann *et al.*, 1988a; Hofmann *et al.*, 1988b). Las BBMV están formadas por la membrana apical de las células columnares, que son precisamente las que contienen la estructura de borde en cepillo.

Mediante el análisis de los datos obtenidos de experimentos de unión de competencias homólogas y heterólogas, se ha podido cuantificar la concentración de receptores y determinar las constantes cinéticas de la unión toxina-receptor. De este modo, se ha establecido una correlación entre la toxicidad y la existencia de receptores en la BBMV (Hofmann *et al.*, 1988a; Hofmann *et al.*, 1988b; Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990; Denof *et al.*, 1993a; Escrache *et al.*, 1994; Estada y Ferré, 1994).

Diseñar un modelo de receptores a través de experiencias de unión es, frecuentemente, complicado, ya que una misma toxina puede unirse a más de un sitio de

unión en un mismo insecto mientras que también puede encontrarse que varias toxinas unan a un mismo lugar (Van Rie *et al.*, 1990a).

No obstante, la correlación general entre toxicidad *in vivo* y la concentración de receptores o la afinidad en la unión no parece estar relacionada en todos los insectos estudiados. Estudios realizados con Cry1Ac (Garczynski *et al.*, 1991) y con Cry1C (Van Rie *et al.*, 1990a) muestran unión en larvas no susceptibles de *S. frugiperda* y *H. virescens* respectivamente. Estos resultados parecen indicar que la unión de las toxinas al intestino de los insectos explica la especificidad, pero no la toxicidad. Es decir, la unión de las toxinas al intestino de los insectos observada *in vitro*, es requisito indispensable pero no suficiente para explicar la toxicidad que se observa *in vivo*. Otra comprobación en dicha línea se observa en los experimentos de Wolfersberger (1990), en los que se muestra como en *L. dispar* la toxina Cry1Ab resulta ser más tóxica que Cry1Ac y sin embargo las constantes cinéticas obtenidas en estas experiencias demuestran que Cry1Ac tiene mayor afinidad por los sitios de unión que Cry1Ab.

Paralelamente a la caracterización de la unión de  $\delta$ -endotoxinas a las BBMV de insectos, diferentes grupos han intentado identificar los receptores de las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*. Estos estudios se iniciaron mediante la técnica denominada "ligand-blot" en la cual las proteínas componentes de los BBMV de los insectos se fraccionan mediante una electroforesis de proteínas realizadas en geles de poliacrilamida, son transferidas a membranas de nitrocelulosa y detectadas mediante toxina marcada radiactivamente (Garczynski *et al.*, 1991; Vadlamudi *et al.*, 1993) o mediante anticuerpos contra las toxinas (Knowles y Ellar, 1986; Knowles *et al.*, 1991; Oddou *et al.*, 1991; Sanchis y Ellar, 1993). Los primeros estudios fueron realizados con cultivos de líneas celulares de insecto. Usando la línea celular CF-1 del lepidóptero *Choristoneura fumiferana*, Knowles y Ellar (1986) encontraron que las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 se unían a una glicoproteína de 146 kDa. En sucesivas investigaciones se ha demostrado que en *S. littoralis*, Cry1C se une a dos proteínas de 40 y 65 kDa y Cry1Ac a otra de 40kDa y débilmente a una proteína de 120 kDa (Garczynski *et al.*, 1991; Sanchis y Ellar, 1993). En *H. virescens*, 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). Similares experimentos se han llevado a cabo, identificándose un número de proteínas capaces de unir las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*. (tabla 1).

**Tabla 1.- Proteínas a las cuales se unen ICPs de *B. thuringiensis* identificadas mediante Western blotting.**

Insecto	Toxina	Receptor	Referencia*
<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa	210	1
	Cry1Ab	210	1, 2
	Cry1Ac	210, 120	1, 3, 4, 5
<i>Pieris brassicae</i>	Cry1Ac	125	3
<i>Heliothis virescens</i>	Cry1Aa	170	8, 9
	Cry1Ab	170	8, 9
	Cry1Ac	140, 120	8, 9
		155, 120, 103, 90, 63,	6
		68, 50	3
	Cry1Ca	40	8
<i>Spodoptera littoralis</i>	Cry1Aa	160	9
	Cry1Ab	160	9
	Cry1Ac	125, 115	9
		(120), 40	7
	Cry1Ca	40	7, 9
<i>Spodoptera exigua</i>	Cry1Aa	200, 180	9
	Cry1Ab	200, 180	9
	Cry1Ac	130, 115	9
	Cry1Ca	40	9
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cry1Ac	148	6
<i>Lymantria dispar</i>	Cry1Ac	120	10
<i>Tenebrio molitor</i>	Cry3A	144	11
<i>Anopheles Stephensi</i>	Cry4D	148	12
<i>Tipula oleacea</i>	Cry4D	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.

No se conoce mucho acerca de la naturaleza molecular de las proteínas que unen las toxinas de *B. thuringiensis*. Se ha propuesto que una aminopeptidasa es la molécula capaz de unirse a Cry1Ac en *M. sexta* (Knight *et al.*, 1994) y en *L. dispar* (Valaitis *et al.*, 1995). Mientras que la unión de Cry1Ab en *M. sexta* se produce mediante una proteína tipo cadherina (Vadlamud *et al.*, 1995).

En general, se acepta que resultado de la unión de una toxina a una proteína de membrana de un insecto, es la formación de un poro en dicha membrana. Sin embargo, no está claro como la toxina o el complejo toxina-proteína produce la formación de un poro.

Se ha intentado buscar explicaciones respecto a la función de los receptores de las ICP de que *B. thuringiensis*, pero, para clarificar la función precisa que realiza el receptor, será necesaria su purificación, además de reconstruir su funcionalidad mediante bicapas lipídicas artificiales, donde los efectos e interacciones con las toxinas puedan ser estudiadas en detalle.

#### 4.3.- Formación del poro y lisis celular.

Se sabe que ciertas toxinas de naturaleza proteica producidas por procariontes actúan formando un poro en sus membranas diana y las evidencias parece indicar que *B. thuringiensis*, después de la unión al receptor, también actúa siguiendo la misma estrategia. La interacción toxina-receptor es bifásica, es decir, presenta una fase inicial de unión reversible que rápidamente se vuelve irreversible (Van Rie *et al.*, 1989). El paso irreversible refleja la inserción de la toxina dentro de la membrana (Wolfersberger *et al.*, 1987), momento en el cual se produce la formación de un poro o de una lesión en la membrana epitelial del intestino medio de los insectos.

En los últimos años se han propuesto tres hipótesis para la acción de las ICP:

- Las  $\delta$ -endotoxinas aumentarían selectivamente la permeabilidad del ión  $K^+$ , formando de alguna manera junto con el receptor poros altamente específicos para este ión. Esta hipótesis se basa en la observación, en *P. brassicae*, de que el transporte de aminoácidos a través de las vesículas, que es dependiente del gradiente de potasio, se inhibe por las proteínas Cry (Sacchi *et al.*, 1986). La inhibición está causada por la formación de poros específicos para  $K^+$ . El flujo del ion por los poros reduce el gradiente del que depende el transporte de aminoácidos.
- Las  $\delta$ -endotoxinas, bien solas o junto con el receptor, formarían poros no específicos, únicamente selectivos para el tamaño de las moléculas a las que permiten el paso (Knowles y Ellar, 1987). La confirmación de que estos poros se pueden producir se ha realizado mediante estudios con bicapas lipídicas y varias ICP (Knowles *et al.*, 1989; Stalin *et al.*, 1990).
- Las  $\delta$ -endotoxinas inhibirían directamente las ATP-etas de la membrana plasmática (English y Cantley, 1986). Esta hipótesis se descartó posteriormente puesto que las ATP-etas no se localizan en el exterior de la membrana apical de las células columnares del intestino y en ningún momento, se ha podido observar

que las toxinas hayan de ser internalizadas para producir su acción (Fast *et al.*, 1978, Dow, 1986).

La estructura propuesta para las proteínas Cry apoyaría las dos primeras hipótesis, con el dominio de las hélices anfipáticas localizadas en el fragmento N-terminal implicado en la formación del poro. Una evidencia indirecta de esta implicación sería el hecho de que cuando se introducen aminoácidos cargados en este dominio hidrofóbico de Cry1Ac, se produce una menor actividad insecticida de esta toxina (Wu y Aronson, 1990).

## 5.- RESISTENCIA A INSECTICIDAS BASADOS EN *Bacillus thuringiensis*.

En la actualidad, y después de 30 años de uso de *B. thuringiensis* como insecticida, sólo *P. xylostella* ha sido capaz de desarrollar resistencia a dichos productos en la naturaleza. Las resistencias descritas por el momento se presentan en: Filipinas, Japón, Malasia, Hawai, Florida, Pensilvania, China y Tailandia (Tabashnik 1994c), y siempre contra *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Tabashnik *et al.*, 1990; Shelton y Wyman, 1990; Marrone y MacIntosh, 1993), salvo en el caso de la población de Malasia que también se muestra resistente frente a *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Wright *et al.*, 1997). Pero no es de extrañar que su número aumente paralelamente al mayor uso *B. thuringiensis* como insecticida.

La aparición de resistencias frente a los insecticidas es uno de los problemas más graves a los cuales se enfrenta la agricultura, ya que los insectos son capaces de producir resistencias tanto frente a insecticidas biológicos como químicos. De hecho, en la actualidad se han descrito más de 500 especies de insectos y ácaros resistentes a algún insecticida (McGaughey y Whalon, 1992). Debido al alto potencial evolutivo de los insectos, parece inevitable la aparición de resistencias, por lo que, debido al alto coste económico que supone el desarrollo de un nuevo insecticida, es necesario intentar retrasar su aparición y controlar su extensión geográfica.

La resistencia es definida por la Organización Mundial de la Salud como “el desarrollo, en una cepa de un organismo, de la capacidad de tolerar dosis de una sustancia tóxica que produciría la muerte en la mayoría de individuos de una población normal (susceptible) de la especie” (Mullin y Scott, 1992). La aparición de la resistencia es pues el resultado de un proceso de selección sobre los individuos portadores de genes de



resistencia, de tal manera que aumentará la frecuencia del gen mientras se siga utilizando el producto selectivo. Los niveles de resistencia y variabilidad de las poblaciones frente a un insecticida pueden ser calculados mediante el cálculo de la  $LC_{50}$  (dosis que produce el 50% de mortalidad) y la pendiente de la línea de regresión dosis-mortalidad.

### **5.1.- Mecanismos de adquisición de resistencia en insectos.**

La acción de los insecticidas se produce sobre alguna de las funciones fisiológicas básicas para la vida, por tanto la resistencia aparecerá, como respuesta del insecto para intentar restablecer su orden interno, en cualquiera de las etapas en las que puede afectar el tóxico. Cada una de estas etapas está controlada por al menos un gen que puede presentar distintos alelos. Alguno de estos alelos son los que, mediante un cambio, podrán conferir la resistencia.

Los cambios pueden afectar de diferentes modos:

- Evitando el contacto con el insecticida, aunque este mecanismo es bastante difícil de estudiar y por tanto existe muy poca bibliografía al respecto. Además, supone un cambio en el comportamiento del insecto que debe ponerse de manifiesto mediante un cambio a nivel molecular.

- Disminuyendo la penetración del insecticida, lo que significaría un retraso en la acción sobre la "diana" del insecticida y, por tanto, mayor facilidad de desintoxicación de los insectos mediante mecanismos enzimáticos. Frecuentemente este modo de adquisición de resistencias va acoplado a otro mecanismo.

- Aumentando su desintoxicación o su excreción mediante la presencia de actividades enzimáticas capaces de modificar el insecticida haciéndolo más hidrofílico y menos tóxico. Además, éstas pueden ser aumentadas mediante selección en presencia del insecticida. Las actividades enzimáticas suelen modificar el compuesto activo del insecticida haciéndolo más fácilmente excretable. El aumento de las actividades enzimáticas también puede deberse a un cambio en la conformación del enzima o a un aumento de la cantidad. Este mecanismo de resistencia es el que más frecuentemente se ha encontrado en insectos.

- Modificando la estructura "diana" provocando cambios en la sensibilidad de la molécula. El insecto será capaz de sobrevivir en presencia del producto si, por un

lado, modifica la molécula blanco del insecticida de forma que éste ya no la reconozca y, por otro, esta modificación no afecte a su función biológica habitual.

- Impidiendo la acción de las proteasas y, por tanto, la activación del tóxico.
- Mejorando los mecanismos de reparación del daño producido de modo que la disfunción creada por el tóxico se pueda superar con un cambio metabólico que la contrarreste.

## 5.2.- Genética de la resistencia.

El conocimiento de las bases genéticas de la resistencia es esencial para desarrollar estrategias que retrasen su aparición. La investigación sobre número de genes implicados, relaciones de dominancia entre alelos, si son autosómicos o ligados al sexo y la ecología de la especie plaga, nos permite detectar su riesgo de aparición.

Roush y McKenzie (1987) concluyeron que las cepas de insectos de laboratorio, iniciadas a partir de una pequeña muestra de la variabilidad total de la especie, desarrollaba generalmente mecanismos poligénicos de resistencia. Por tanto, hay que tener en cuenta que quizá este tipo de selección no refleje la situación en el campo. Esta diferencia es debida a que en una población natural, el alelo de la resistencia puede estar presente aunque con baja frecuencia. Después, y mediante selección, la frecuencia aumenta y por tanto la resistencia que aparece es monogénica. Por el contrario, en una población de laboratorio es improbable que tengamos el alelo de la resistencia y por tanto ésta aparece como resultado de la acción de varios genes. Una solución para minimizar este problema es iniciar la selección a partir de una muestra de una población previamente tratada con el insecticida, de modo que la frecuencia del alelo será mayor. Si bien, otra solución sería comenzar la selección con una muestra de individuos mayor.

El método utilizado para el estudio de la herencia de la resistencia es el cruce entre colonias sensible y resistentes, aunque no siempre es posible que las dos colonias cruzadas tengan la misma procedencia.

En poblaciones cuya resistencia es debida a un aumento en la desintoxicación, el modo de herencia puede ser monogénico o poligénico. Así, en dos poblaciones isogénicas del coleóptero *Leptinotarsa decemlineata*, la resistencia a Abamectin, es parcialmente recesiva y poligénica (Argentine et al., 1992). En una población del ácaro *Metaseiulus occidentalis*, se ha demostrado que la resistencia a carbaril está implicado un

único gen con dominancia incompleta (Roush y Plapp, 1982). Yu y Nguyen (1994), observaron que en una colonia derivada de población natural de *S. frugiperda* procedente de Florida, presentaba resistencia frente a carbaril debida a un único gen autosómico y parcialmente dominante.

Sin embargo, cuando la resistencia aparece por la modificación de la molécula diana del insecticida, aparece implicado únicamente un gen. Por ejemplo, en una población del coleóptero *Sitophilus zeamais* con resistencia cruzada a DDT y piretroides, se demostró que se heredaba según un modelo de un único gen recesivo y ligado al sexo (Guedes et al., 1994). En una colonia de *H. virescens*, resistente también a piretroides, el alelo que confería resistencia era autosómico y de herencia intermedia (Payne et al., 1988). En *Musca domestica*, cuya resistencia a DDT y piretroides era totalmente recesiva y el gen mutado mapeaba en el gen de un canal de sodio (Williamson et al., 1993). Otro caso en el que se ha demostrado que la resistencia es debida a la modificación de la molécula diana es la resistencia a insecticidas tipo ciclodieno. Parece ser que en la mayoría de los casos descritos, el responsable de la resistencia es un único gen parcialmente dominante (Ffrench-Constant, 1994).

### 5.3.- Resistencia frente a *Bacillus thuringiensis*.

Al igual que ocurre con el resto de insecticidas, la aparición de resistencias frente a los preparados comerciales de *B. thuringiensis* era inevitable. De modo que las resistencias han aparecido en las zonas en las que se han utilizado exhaustivamente estos productos como bioinsecticidas (Stone et al., 1991; Tabashnik, 1994).

Los experimentos de selección realizados en el laboratorio ha demostrado que especies como *Plodia interpunctella*, *Heliothis virescens*, *Candria cautella*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Trichoplusia ni*, *Leptinotarsa decemlineata* y *Chrysomela scripta* pueden desarrollar resistencia frente a *B. thuringiensis* aunque por el momento la única especie que ha desarrollado niveles de resistencia significantes en la naturaleza ha sido *P. xylostella* (Tabashnik, 1990).

En la tabla 2 se pueden observar las selecciones llevadas a cabo tanto en la naturaleza como en el laboratorio en las diferentes especies que actualmente presentan resistencias a productos derivados de *B. thuringiensis*.

**Tabla 2: Algunos casos de resistencias encontradas en diferentes especies de insectos frente a *B. thuringiensis* (Ferré et al., 1995).**

Especie	Origen	Agente selectivo <sup>1</sup>	Ambiente selectivo	Razón de la resistencia <sup>2</sup>	Ref. <sup>3</sup>
<i>P.interpunctella</i>	Oklahoma	Dipel	Laboratorio	Dipel >250	[1]
				Dipel 140	[2]
<i>P.interpunctella</i>	Kansas	<i>Bte</i>	Laboratorio	Cry1Ab 13	[3]
				Cry1Ac 128	[3]
				Cry1C 6	[3]
<i>P. xylostella</i>	Filipinas	Dipel	Campo	Cry1Ab >200	[4]
<i>P. xylostella</i>	Hawaii	<i>Bt/Dipel</i>	Campo/Lab	Cry1Ac >59	[5]
				Dipel 130	[5]
				Dipel 700	[6]
<i>P. xylostella</i>	Florida	<i>Bt</i>	Campo	Javelin 1640	[7]
				Dipel 22	[7]
<i>P. xylostella</i>	Malasia	<i>Btk/Bta</i>	Campo	Dipel 600	[10]
				Javelin 300	[10]
<i>H.virescens</i>	Carolina N.	Cry1Ac	Laboratorio	Cry1Ab 2300	[8]
				Cry1Ac 10000	[8]
				Cry1F 3700	[8]
				Cry2A 25	[8]
<i>H. virescens</i>	Carolina N.	Cry1Ab/Dipel	Laboratorio	Cry1Ab 71	[2]
				Cry1Ac 16	[2]
				Dipel 57	[9]
<i>H. virescens</i>	Carolina N.	Cry1Ac	Laboratorio	Cry1Ab 13	[9]
				Cry1Ac 50	[9]
				Cry2A 53	[9]
<i>C. scripta</i>	EE.UU	<i>Btm</i>	Laboratorio	70	[11]
<i>L.decemlineata</i>	EE.UU	<i>Btm</i>	Laboratorio	50	[11]

<sup>1</sup> *Bte* es *B. thuringiensis* var. *entomocidus*, *Btk* es *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *Bta* es *B. thuringiensis* var. *aizawas*, *Btm* es *B. thuringiensis* var. *morrisonne* y *B.t.* es un formulado comercial de *B. thuringiensis*. Dipel y Javelin son marcas registradas de formulaciones de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

<sup>2</sup> El radio de la resistencia se calcula dividiendo la LC<sub>50</sub> (o LD<sub>50</sub>) de la cepa resistente por la LC<sub>50</sub> (o LD<sub>50</sub>) de la cepa sensible.

<sup>3</sup> 1, Van Rie et al., 1990a; 2, MacIntosh et al., 1991; 3, Oppert et al., 1994; 4, Ferré et al., 1991; 5, Tabashnik et al., 1994c; 6, Tabashnik et al., 1992a; 7, Shelton et al., 1993; 8, Gould et al., 1995; 9, Gould et al., 1992; 10, Wright et al., 1997; 11, Whalon et al., 1993)

### 5.3.1.- Mecanismos de resistencia a *Bacillus thuringiensis*.

Los preparados comerciales de *B. thuringiensis*, al igual que el resto de insecticidas, presentan un determinado modo de acción. Es precisamente en algunos de los

pasos de este modo de acción (ver apartado 4) donde, teóricamente, podríamos encontrar las bases bioquímicas de la resistencia.

Algunos mecanismos bioquímicos se han relacionado directamente con casos de resistencias a *B. thuringiensis*. Así pues, podemos clasificar las resistencias encontradas en *B. thuringiensis* en tres grupos:

1. Resistencia debida a la alteración de la proteólisis de las ICP.
2. Resistencia debida a modificaciones en el sitio de unión.
3. Otros mecanismos no determinados.

#### 1. Resistencia debida a la alteración de la proteólisis de las ICP.

Los primeros estudios realizados para investigar la posible relación entre el proceso proteolítico de las ICP y la resistencia, se realizaron en *P. interpunctella* (Johnson *et al.*, 1990). Se comparaban dos cepas, una seleccionada y resistente a Dipel y otra control no seleccionada, para ver su capacidad para activar las protoxinas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD1 y *B. thuringiensis* var. *aizawai* cepas HD-133 y HD-134. No se encontraron diferencias.

En estudios posteriores con otra cepa de *P. interpunctella* resistente a Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1C, se encontró relación entre un procesado diferente de las toxinas y dicha resistencia. El contenido intestinal de los insectos resistentes mostraba una actividad proteolítica significativamente menor que el de los insectos susceptibles. Además, la activación de la protoxina Cry1Ac fue mucho más lenta con el contenido intestinal de la cepa resistente respecto del control (Oppert *et al.*, 1994).

En la población de Hawaii de *P. xylostella* se realizó también un estudio indirecto sobre la relación de la proteólisis con la resistencia. Los resultados obtenidos mostraban que la proteólisis realizada, bien, mediante tripsina u otra proteasa no afectaban de manera importante al mecanismo de la resistencia (Tabashnik *et al.*, 1992a).

Estudios realizados entre dos cepas de *H. virescens*, una susceptible y otra resistente, mostraron diferencias en la actividad proteolítica del intestino medio frente a toxinas de *B. thuringiensis*, de modo que, mientras la cepa susceptible degradaba lentamente la toxina activa, la cepa resistente lo hacía más rápidamente, estando así el insecto menos tiempo expuesto a su efecto tóxico (Forcada *et al.*, 1996).

## 2. Resistencia debida a modificaciones en el sitio de unión.

La primera resistencia descrita frente a *B. thuringiensis* se realizó en el insecto *P. intepunctella*. Esta resistencia había sido obtenida mediante selección en el laboratorio con Dipel. A pesar de los altos niveles de resistencia del insecto frente a Dipel, se observó que seguía siendo sensible frente a ICP no relacionadas con las Cry1A.

*P. intepunctella* presentaba niveles de resistencia altos para la Cry1Ab pura (tanto protoxina como toxina) y sensibilidad para la toxina Cry1C. Mediante experimentos de unión a BBMV con  $^{125}\text{I}$ -Cr1Ab, se demostró que la cepa resistente presentaba una menor afinidad por la proteína Cry1Ab (Van Rie *et al.*, 1990b), aunque el número de sitios de unión de ésta cepa respecto a la control no variaba. Sin embargo, no se observó esta diferencia entre las dos cepas en el caso de la Cry1C. Esta era la prueba que demostraba la especificidad de la resistencia, es decir, la resistencia se debía a una alteración en el sitio de unión de la Cry1Ab.

*P. xylostella* ha sido el único insecto capaz de desarrollar resistencia en el campo, pero esta resistencia sólo se han presentado contra formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, pero sin extenderse a otras variedades de *B. thuringiensis* salvo en el caso de la población de Malasia en la que también se ha descrito resistencia frente a *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Wright *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha observado que una población de Filipinas presenta la resistencia a Cry1Ab pero no a Dipel (Ferré *et al.*, 1991). Los mecanismos de resistencia se estudiaron mediante individuos recogidos de la naturaleza que presentaban un nivel de resistencia para la Cry1Ab de  $>200$  respecto a los individuos de la cepa sensible. Sin embargo, esta resistencia no se extendía a otras ICP como Cry1B, Cry1C o Dipel. Mediante experimentos de unión a BBMV con  $^{125}\text{I}$ -Cy1Ab,  $^{125}\text{I}$ -Cy1B y  $^{125}\text{I}$ -Cy1C, se demostró que en la cepa sensible, Cry1Ab, Cry1B y Cry1C reconocían diferentes sitios de unión a la membrana con alta afinidad. Y mientras que en la cepa resistente no se apreciaba diferencia entre la unión de Cry1B y Cry1C respecto a la sensible, para Cry1Ab esta unión no se observó. Por tanto, al igual que con *P. intepunctella*, se pudo concluir que, la resistencia en *P. xylostella* se debía a un cambio en el sitio de unión de Cry1Ab.

En una población de *P. xylostella* procedente de Hawaii se demostró que la unión de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac a vesículas estaba altamente disminuida (Tabashnik *et al.*, 1994a).

Este mismo mecanismo de resistencia fue encontrado en una población de *P. xylostella* de Florida. Mediante la técnica de unión de Cry1Ab marcada con biotina, a secciones de tejido intestinal, se demostró la incapacidad de unión de esta toxina (Tang *et al.*, 1993b)

Por el momento, el mecanismo de resistencia descrito en *P. xylostella* es debido a un cambio en el sitio de unión de las ICP salvo en el caso de la población de Malasia (Wright *et al.*, 1997). El hecho de que en esta especie la resistencia implique a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac pero no a otras, podría explicarse si el sitio de unión modificado es común para las tres como se ha demostrado en otros insectos como *H. virescens* (Lee *et al.*, 1995). Este insecto tiene tres sitios de unión diferentes, uno compartido por las tres, otro compartido sólo por Cry1Ab y Cry1Ac y el último reconocido únicamente por Cry1Ac (Van Rie *et al.*, 1989). Una modificación en el lugar de unión compartido por las tres podría explicar la no unión de la toxina Cry1Aa a vesículas de membrana de individuos resistentes. Para explicar la resistencia de Cry1Ab y Cry1Ac cabe pensar que los otros lugares de unión no juegan el mismo papel en la toxicidad.

La unión de Cry1C, encontrada en una población de *S. exigua* seleccionada con Cry1C, aparece reducida a la mitad comparada con la población sensible. No se han encontrado diferencias en la concentración de los sitios de unión pero sí en su constante de disociación (Moar *et al.*, 1995). Sin embargo, las pequeñas diferencias en la Kd no puede explicar la diferencias encontradas a nivel de unión para Cry1C.

### 3. Otros mecanismos de resistencia.

En diferentes insectos como *H. virescens* (MacIntosh *et al.*, 1991; Gould *et al.*, 1992). y *P. xylostella* (Wright *et al.*, 1997) no se pudo relacionar con procesos proteolíticos ni con cambios en sitios de unión la alta resistencia encontrada para las toxinas Cry1A. La resistencia en esos casos podría explicarse mediante otros mecanismos que afecten a cualquier otro paso de la acción de las toxinas, desde una mala solubilización de las protoxinas en el intestino hasta procesos anómalos en la formación del poro. Pero todos estos mecanismos están por demostrar.

#### **6.3.2.- Genética a de la resistencia a *B. thuringiensis*.**

### 6.3.2.- Genética a de la resistencia a *B. thuringiensis*.

Al igual que ocurre con los insecticidas químicos, el conocimiento de las bases genéticas de la resistencia es esencial para desarrollar estrategias que retrasen su aparición. Se han descrito casos de resistencias frente a *B. thuringiensis*, que se han estudiado mediante cruces genéticos entre las cepas susceptibles y resistentes, obteniendo una información muy valiosa acerca de la herencia de la resistencia.

En *P.interpunctella* la resistencia sigue una herencia de tipo autosómica recesiva. Dada la rapidez con la que aparece la resistencia en este insecto cuando se le selecciona aunque sea con bajas dosis de insecticida, se puede pensar que hay un único gen mayor responsable de dicha resistencia. (McGaughey y Beeman, 1988).

En el caso de *P. xylostella*, se fundaron cepas de insectos capturados de tres poblaciones resistentes (Hawái, Japón y Filipinas) y fueron analizadas: la cepa resistente de Hawái presenta un modelo que se ajusta a un solo gen autosómico recesivo (Tabashnik *et al.*, 1992); la cepa resistente de Japón (Hamma *et al.*, 1992) presentaba un resultado similar aunque en este caso, el gen era parcialmente recesivo y, finalmente, en la 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).

En otros insectos como *H.virescens*, resistentes tras su selección en el laboratorio, los resultados determinaban, para Cry1Ab y Cry1Ac, una herencia autosómica, parcialmente recesiva y muy probablemente debida a un solo gen. Sin embargo para Cry2A, había un efecto más aditivo de genes (Gould *et al.*, 1992). En otra cepa de *H. virescens*, seleccionada con una cepa de *P. fluorescens* que ha sido modificada para producir la protoxina Cry1Ab, se ha encontrado que la herencia sigue un tipo de herencia autosómica, con dominancia incompleta, y controlada por diferentes factores genéticos.

En coleópteros como *L. decemlineata*, la resistencia que presenta frente a Cry3A se hereda de forma autosómica y casi totalmente dominante (Rahardja y Whalon, 1995).

En general, las resistencias aparecidas frente a *B. thuringiensis* debidas a la modificación de un receptor, suele deberse a un gen único recesivo o parcialmente recesivo (Ferré *et al.*, 1995).



### 5.3.3.- Resistencia cruzada.

*B. thuringiensis* presenta un modo de acción característico, por tanto, no es de extrañar que no se conozca ningún caso de resistencia cruzada entre sus preparados comerciales e insecticidas químicos. Sin embargo, se han descrito resistencias cruzadas entre diferentes  $\delta$ -endotoxinas producidas por diferentes cepas de *B. thuringiensis*. El estudio de resistencias cruzadas es de gran utilidad para designar estrategias que retrasen su aparición.

Pueden distinguirse dos tipos de resistencia cruzada (Bauer, 1995). El primer tipo hace referencia a la resistencia cruzada como un incremento en la tolerancia de una población, seleccionada con un aislado de *B. thuringiensis*, frente a otro aislado que contenga una mezcla diferente de ICPs. En una cepa de *P. interpunctella* seleccionada y resistente 140 veces frente al aislado HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel), se encontró resistencia cruzada frente a aislados de otras variedades como *thuringiensis*, *galleriae*, *aizawai*, *tolworthi*, *darmstadiensis*, *kenyae* y *entomocidus* (McGaughey y Johnson, 1987). Una cepa de *H. virescens* seleccionada con Cry1Ab y Dipel mostraba distintos grados de resistencia cruzada para 20 variedades diferentes *B. thuringiensis* (Stone *et al.*, 1989). En *P. xylostella* se vio como una cepa seleccionada con *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, presentaba bajos niveles de resistencia cruzada a formulaciones de *B. thuringiensis* var. *aizawai*. (Tabashnik *et al.*, 1993).

El segundo tipo de resistencia cruzada puede definirse como un incremento en la tolerancia de una población a una toxina ausente en la preparación utilizada para la selección. Se han encontrado altos niveles de resistencia cruzada en una población de Hawaii seleccionada con *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, que contiene las toxinas Cry1A y Cry2, y la toxina Cry1F, producida por *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Tabashnik *et al.*, 1994b).

También se han encontrado casos de resistencias cruzadas en cepas de insectos seleccionadas con una sola ICP. Tras seleccionar una cepa *H. virescens* con la cepa HD-73 de *B. thuringiensis*, que expresa únicamente Cry1Ac, se observó resistencia cruzada para Cry1Aa, Cry1B y Cry1C (Gould *et al.*, 1992). Se han encontrado resistencias cruzadas en una cepa de *S. exigua* seleccionada durante siete generaciones con Cry1C. Las resistencias cruzadas que presentaba eran contra Cry1Ab, un híbrido entre Cry1E-Cry1C, Cry1H y Cry2A (Moar *et al.*, 1995).

Sin embargo, en *T. ni* no se encontró resistencia cruzada para las toxinas Cy1Aa y Cry1Ac en una cepa seleccionada para Cry1Ab a pesar de la gran homología que existe entre las toxinas del tipo Cy1A (Estada y Ferré, 1994).

#### **5.4.- Aparición de resistencia en insectos frente a *B. thuringiensis*.**

La capacidad para desarrollar resistencia a un insecticida depende en gran medida de la biología del propio insecto, pero parece ser un hecho generalizado que prácticamente cualquier especie de insecto responde a la selección con ICP, adquiriendo cierta resistencia.

Sin embargo, hay que tener en cuenta las importantes diferencias con las que nos podemos encontrar al comparar una población seleccionada en el campo frente otra seleccionada en el laboratorio debido a que no siempre podemos reproducir las condiciones naturales en el laboratorio.

##### **5.4.1. Procesos de selección en la naturaleza.**

Las poblaciones naturales suelen estar formadas por un alto número de individuos que poseen una combinación genética determinada, lo que significa una gran variabilidad genética. Esta variabilidad se traduce en capacidad para la adaptación al medio y, por tanto, al desarrollo de resistencias. Dentro de las poblaciones los alelos de la resistencia, que pueden aparecer por mutación puntual en un gen, se encuentran en muy baja proporción, pero esta frecuencia alélica puede ir aumentando con el inicio de la presión de selección positiva. Si la presión de selección se realiza a bajos niveles, la población tardará en alcanzar niveles altos de resistencia ya que no todos los individuos sensibles morirán en cada generación de selección. Sin embargo, si la concentración del producto utilizado es tan alta que mata a todos los individuos susceptibles, se producirá rápidamente la fijación del alelo de la resistencia en la población.

En general, la aparición de resistencias de tipo poligénico en poblaciones naturales va a carecer de importancia por la baja persistencia del producto en el campo (Mckenzie y Batterham, 1994).

#### 5.4.2.- Procesos de selección en el laboratorio.

Al comenzar una selección en el laboratorio, estamos tratando con una muestra pequeña de la población que supone un grupo pequeño de insectos comparándolo con el tamaño de toda la población natural. Esto significa que la probabilidad de que en el muestreo incluyamos un alelo mayor de resistencia es muy baja, ya que estos alelos son poco frecuentes en la población. Así pues, el mejor inicio para una selección llevada a cabo en el laboratorio es a partir de una muestra de la naturaleza que haya sido tratada anteriormente con el futuro agente selectivo. La frecuencia estimada de los alelos de la resistencia varía entre 1/2000, en poblaciones no tratadas, a 1/20 en poblaciones que habían sido tratadas periódicamente con insecticida Tabashnik (1994a).

Si la colonia del laboratorio se ha fundado sin contener en ella un alelo mayor de resistencia, puede haber respuesta a la selección, pero la resistencia obtenida se deberá a la acción de varios genes, es decir será una resistencia poligénica, diferente pues al resultado que obtendríamos en el campo. También es posible no tener éxito en la selección en el laboratorio pero eso no significa que ocurra lo mismo en la naturaleza.

#### 5.5. Estabilidad de la resistencia a *B. thuringiensis*.

Después de un proceso de selección tras el cual ha aparecido una resistencia, podemos encontrarnos diferentes tipos de respuestas por parte de los individuos seleccionados, siendo éstas diferentes según el tipo de insecto, de ICP o de cepa de *B. thuringiensis* utilizada para la selección. En *P. xylostella* se han encontrado caídas rápidas de resistencia, de tal modo que en 4 generaciones la  $LC_{50}$  decae la décima parte (Hama *et al.*, 1992), o casos en que se mantiene el valor de la  $LC_{50}$  durante más de 40 generaciones (Tabashnik *et al.*, 1995). Los estudios realizados por Tabashnik *et al.*, (1995), mostraron que la resistencia encontrada en la población de *P. xylostella* de Hawái no estaba controlada por un sólo locus con dos alelos (R x S), ya que si así fuera una simple exposición a una alta concentración sería suficiente para matar a todos los individuos homocigóticos susceptibles (SS), sino por uno o más alelos en uno o dos loci.

Los alelos que confieren resistencia pueden llevar asociado un coste en la eficacia biológica, de tal manera que, en ausencia de presión de selección resulta más eficaz la restauración de la susceptibilidad. Pero tanto el flujo genético entre colonias como las

mutaciones espontaneas pueden introducir genotipos susceptibles en una cepa seleccionada y, por tanto, producir la restauración de la susceptibilidad.

Las poblaciones que restauran la susceptibilidad suelen responder rapidamente a la reelección. Además, no se llega a restablecer completamente la susceptibilidad aun en ausencia de selección (Tabashnik *et al.*, 1994a).

#### 6.6.- Estrategia para evitar el desarrollo de las resistencias en plagas.

Algunas de las estrategias, propuestas por primera vez por Marrone y MacIntosh en 1993 y posteriormente por Tabashnik en 1994, para evitar la aparición de resistencias frente a *B. thuringiensis* han sido:

1. Mezcla. Se basa en la aplicación de dos o más insecticidas al mismo tiempo, presentando cada uno un modo de acción diferente. De tal manera que la probabilidad de que un individuo presente la capacidad de producir resistencia a los dos insecticidas sea muy baja.

2. Sinergismos. Implica la utilización de un agente diferente al insecticida de tal modo que con él aumente su toxicidad. Esto permite utilizar insecticidas de baja capacidad tóxica o menores dosis de insecticidas tóxicos.

3. Mosaicos. Consiste en aplicar distintos insecticidas en pequeñas zonas próximas de modo que trabajamos con poblaciones pequeñas, disminuyendo así la probabilidad de que aparezcan individuos resistentes. Aún en el caso de que dichos individuos resistentes aparecieran, probablemente morirían al pasar a otras zonas tratadas con diferentes insecticidas.

4. Rotaciones. Supone la alternancia a lo largo del tiempo de productos pesticidas de diferente acción. De modo que la probabilidad de que un individuo resistente a un producto lo sea también para un segundo sea muy baja. El hecho de que la resistencia suela llevar asociada una menor viabilidad supone una ventaja añadida, ya que al cesar la selección positiva para la resistencia, disminuirá el número de individuos resistentes dentro de la población.

5. Ultradosis. Se aplican dosis muy elevadas de insecticidas de modo que se eliminan todos los individuos de la población. Esta estrategia presenta la gran ventaja de que el cultivo no sufre ningún tipo de daño, pero también supone un gran inconveniente y

es que en el caso de que existieran individuos homocigóticos resistentes, el desarrollo de la resistencia sería muy rápido.

6. Refugios. Se trata de mantener, dentro de una población, una proporción alta de individuos con genotipo sensible frente a los resistentes. Para ello, y aprovechando la mayor eficacia biológica en individuos con genotipo sensible, se debe proporcionar refugio a poblaciones sensibles dejando temporal o espacialmente zonas de plantación sin tratar.

## 6.- DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL INSECTO

### *Plutella xylostella*.

*Plutella xylostella* (L), más conocida como la polilla de las crucíferas, es un lepidóptero de la familia Ypomomeutidae que ataca a las crucíferas, tanto silvestres como cultivadas, pero fundamentalmente al género Brassica. Este lepidóptero plaga es el que presenta una distribución más cosmopolita, llegando a presentarse desde el círculo Polar Ártico a los Trópicos. Sin embargo, se piensa que el hábitat inicial fue alrededor del Mediterráneo (Hardy, 1938), lugar idóneo para el crecimiento de las crucíferas, y que junto con la expansión del cultivo de esta familia de plantas, se introdujo la plaga a las diferentes zonas hoy castigadas por este insecto.

El ciclo vital de este insecto es muy variable, dependiendo de las condiciones en las que se desarrolla. En la naturaleza presenta de 4 a 5 generaciones por año, mientras que en nuestras condiciones de laboratorio, 25°C y 70-80% de humedad relativa, el ciclo, desde el estadio de huevo hasta que emergen los adultos, se completa en unos 20-25 días. La hembra realiza la puesta durante la noche, principalmente en el envés de la hoja, formando pequeños acúmulos. La eclosión de los huevos tiene lugar a los 2-4 días de la puesta y las larvas se alimentan de las hojas de col en las que se encuentran. El periodo larvario comprende cuatro estadios que suponen un periodo de tiempo de 10-12 días, llegando a alcanzar un tamaño de 8 mm.

Una vez transcurrido este tiempo las larvas forman la crisálida, estadio en el que permanecerán hasta transcurridos 3-4 días, después de los cuales emergerán de nuevo los adultos.

*P. xylostella* produce grandes pérdidas económicas en los cultivos de todo el mundo. Por ello ha sido tratada durante mucho tiempo con diferentes insecticidas

capacidad para desarrollar resistencias frente a todos los compuestos que se han utilizado contra ella, provocando una búsqueda continua de nuevos insecticidas alternativos. Como resultado de esta búsqueda se han encontrado virus, hongos y microorganismos tóxicos para *P. xylostella* junto con la bacteria *B. thuringiensis*.

## 7.- MUTAGÉNESIS

En sentido amplio podemos considerar la mutagénesis como toda alteración o cambio estable en el material genético. Las mutaciones se dan en todos los organismos de un modo espontáneo y con una frecuencia baja. Podemos distinguir dos tipos de mutaciones: las espontáneas, es decir, que se producen sin ninguna causa externa aparente, y las provocadas por agentes mutágenos, tanto químicos como físicos. Estos agentes mutágenos van a incrementar notablemente la frecuencia de mutación. Un ejemplo de ellos son los agentes alquilantes.

Los agentes alquilantes actúan transfiriendo grupos alquilo a macromoléculas de importancia biológica y se clasifican en diferentes clases. Las diferencias entre las distintas clases viene dada por dos propiedades cuyo papel en la mutagenidad del agente parece importante. Una de ellas es el grupo alquilo que transfiere a la molécula de DNA: etil; metil; o grupos más complejos. La otra, es el número de grupos alquilo que una sola molécula puede ceder.

El metano sulfonato de etilo (EMS) forma parte del grupo de agentes alquilantes. Este compuesto produce transiciones del tipo GC----->AT, como se ha demostrado en bacterias (Swartz, 1963) y en bacteriófagos (Krieg, 1963). La acción de los alcanosulfonatos es muy similar, incluso el metano sulfonato de metilo (MMS) tiene mayor acción mutagénica en algunos microorganismos, sin embargo, el EMS presenta una serie de ventajas en su uso que, unido a su alta eficacia en cuanto a la inducción de mutaciones, lo han convertido en el mutágeno más utilizado en el estudio de la genética, especialmente en el insecto modelo, *Drosophila melanogaster*.

Las ventajas del agente alquilante EMS son, su solubilidad en agua y la gran estabilidad de su molécula.

La mutagénesis con EMS suele realizarse preferentemente sobre machos. Esta preferencia está justificada por dos razones: una, porque un macho puede fecundar a

varias hembras y, la otra, porque el efecto mutagénico del es 5 veces mayor sobre los espermatoцитos que sobre los oocitos.

## OBJETIVOS



## OBJETIVOS

- Análisis toxicológico de la población natural de *Plutella xylostella* procedente de Filipinas, frente a las ICPs de *Bacillus thuringiensis* mediante el estudio comparativo de las muestras poblacionales R1 y R2.
- Estudio de la capacidad del insecto para desarrollar resistencias a las ICPs de *Bacillus thuringiensis* del grupo Cry1 y al preparado Myx-03604 mediante la realización de selecciones artificiales en el laboratorio.
- Determinación del modo de herencia de la resistencia a las ICPs del grupo Cry1A en dos poblaciones de *Plutella xylostella* una susceptible y otra resistente.
- Caracterización del modo de acción de tres ICPs del grupo Cry1A en *Plutella xylostella*. Estudio bioquímico implicado en la resistencia.
- Análisis de la toxicidad y el modo de acción de nuevas ICPs obtenidas mediante modificaciones genéticas frente a una población de *Plutella xylostella*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## 1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

### 1.1.- Poblaciones de *Plutella xylostella*.

Población Susceptible (S): Fundada con insectos capturados originariamente en Holanda. Esta población había sido mantenida durante más de 60 generaciones en el laboratorio sin ningún contacto con insecticidas.

Población de Filipinas (R): Se obtuvieron dos muestras de dicha población: una en 1989 (BL1) y otra en 1993 (BL2). Ambas se fundaron a partir de pupas recogidas en la Isla de Luzon en el Valle Trinidad cerca de la ciudad de Baguio, en Filipinas.

La subpoblación BL1 fue analizada inicialmente por Ferré *et al* (1991) quienes determinaron una resistencia específica a Cry1Ab de aproximadamente 200 veces. Esta resistencia podía atribuirse a una modificación en el sitio de unión para la ICP Cry1Ab. El objetivo del presente trabajo fue el estudio comparativo de las dos subpoblaciones BL1 y BL2.

Población Resistente de Hawaii (NO-QA): El profesor Tabashnik nos proporcionó 800 larvas congeladas a partir de las cuales se prepararon BBMV's.

Población Resistente de Pensilvania (EG): Al igual que en la población QA, T. Malvar nos proporcionó larvas congeladas (1.000) para estudios bioquímicos.

### 1.2.- Mantenimiento de *Plutella xylostella* en el laboratorio.

Las poblaciones se mantenían en una cámara termorregulada a una temperatura de 25°C, con una humedad relativa del 80% y un fotoperiodo de 16:8 h (luz:oscuridad). Bajo estas condiciones, el ciclo completo de huevo a adulto era de 20-25 días.

Los adultos se mantenían en cajas de madera rectangulares de tamaño (50 x 40 x 35) cm. En el interior de dichas cajas se introducía una hoja de col junto con tiras de parafilm, en las cuales las hembras hacían la puesta de los huevos. A los dos-tres días de la puesta, los huevos se disponían en una jaula cilíndrica de metacrilato con hojas de col que eran renovadas cada dos días hasta llegar al estadio de crisálida. Los adultos, una vez emergidos, se recogían con un aspirador y eran introducidos de nuevo en la caja de madera completando así el ciclo.

Las larvas se alimentaron con coles de la variedad Sentinel mientras que a los adultos se les proporcionaba una disolución de agua y miel al 10% como único alimento.

### 1.3.- Compuestos biológicos.

Los compuestos biológicos no comerciales fueron suministrados por :

Plant Genetic Systems (PGS) (Gante, Bélgica), dentro del acuerdo del proyecto financiado por la CEE dentro del programa ECLAIR. Estos compuestos fueron ICPs del grupo Cry1, purificadas a partir de *Bacillus thuringiensis* o expresadas en *Escherichia coli*, y anticuerpos específicos contra las ICPs de tipo monoclonal desarrollados en ratón y policlonal desarrollados en conejo.

La empresa CPRO-DLO (Holanda) suministró ICPs quiméricas, expresadas en *Escherichia coli*, del grupo Cry1. Estas ICPs quiméricas procedían de la recombinación entre los tres dominios de las ICP's I, II y III.

El laboratorio de Luke Masson (Montreal, Canadá) nos suministraba cuerpos de inclusión de las ICPs del grupo Cry1 obtenidos a partir de *E. coli* que contenían como contaminante restos de las membranas celulares de *E. coli*. Estos Cuerpos de Inclusión estaban resuspendidos en agua.

La empresa Mycogen Corporation (San Diego, CA, USA) nos suministró su producto Myx-03604 que contenía como componente activo una protoxina híbrida entre las ICP's Cry1Ab y Cry1Ac.

Los compuestos biológicos comerciales que se utilizaron fueron Dipel 2x (Abbott Laboratories, Chicago, USA) y Thuricide (Sandoz, Palo Alto, CA, USA). Los dos compuestos eran formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que presentaban como ingrediente activo las ICPs Cry1As (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac) y Cry2As (Cry2A y Cry2B).

## 2.- ENSAYOS DE TOXICIDAD.

Se llevaron a cabo dos tipos de pruebas de toxicidad que fueron las siguientes:

### 2.1.- Ensayos sobre dieta artificial

Los ensayos de toxicidad se realizaron con larvas de tercer estadio como se describió anteriormente (Ferré *et al.*, 1991). Se realizaban cinco diluciones de las ICPs o preparados comerciales de *B. thuringiensis* que se querían probar, mediante tampón Carbonato (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mM DTT, pH10) en el caso de las ICPs o agua destilada en el caso de los preparados de *B. thuringiensis*. Alícuotas de 50 µl de cada dilución, al igual que una alícuota de tampón o agua como control, se aplicaban uniformemente sobre dieta artificial que contenían unas placas con 24 pocillos circulares de 2 cm<sup>2</sup> de superficie (24-well cluster plate, Costar, EE.UU.). Por cada dilución se realizaban de dos a cuatro repeticiones de 12 o 24 larvas, poniéndose una larva por cada pocillo y, al cabo de los 4 días se contaba el número de larvas que habían muerto. La LC<sub>50</sub> (concentración requerida para matar el 50% de los individuos de una población) y las pendientes de las líneas de regresión concentración-mortalidad se obtenían mediante análisis probit (Finney, 1962) con el programa estadístico Polo-PC (Russell *et al.*, 1987).

### 2.2.- Ensayos sobre hojas de col

Se realizó sobre hojas de col un segundo tipo de ensayo descrito con anterioridad por Tabashnik *et al* (1987). Las hojas de col se cortaban en discos de 6 cm de diámetro, los cuales eran sumergidos durante 5 segundos en diluciones de las ICPs o preparados de *B. thuringiensis* que se querían ensayar. Las diluciones de los preparados comerciales de *B. thuringiensis* (Dipel y Thruricide) se realizaron en agua destilada, Myx-03604 en agua destilada con 0.2% de AG98 y las ICPs puras en tampón carbonato con 0.2% de AG98. El AG98 se utilizaba como humectante, es decir, para facilitar el contacto entre la hoja de col con los productos a testar. En caso de los productos comerciales el AG98 no era necesario porque el humectante venía incluido en el producto.

Una vez bañada la hoja, se dejaba secar en posición vertical durante dos horas a 21°C y posteriormente se colocaba cada hoja en una placa Petri. Por cada hoja se colocaban 10 larvas (una réplica). Se realizaron 2-3 réplicas y la mortalidad se contaba a las 48 horas.

El análisis de los resultados se hizo igual en los dos tipos de ensayos de toxicidad.

### 3.- SELECCIÓN ARTIFICIAL PARA LA RESISTENCIA A ICPs

#### 3.1.- Selección con ICPs puras

Las selecciones con las ICPs puras se realizaron mediante las placas de 24 pocillos circulares de 2 cm<sup>2</sup> de superficie (tabla 3 ). Un número conocido de larvas, normalmente del orden de las 800, se sometían a una concentración fija de ICP, que solía ser cercana a la LC<sub>50</sub> de la población. Transcurridos 4 días, se contaban el número de larvas muertas y las vivas eran colocadas en coles frescas hasta llegar a adultos. Estos adultos eran los padres de la siguiente generación.

Periódicamente se realizaban pruebas de toxicidad en la cepa seleccionada obteniéndose la LC<sub>50</sub> y la pendiente. Paralelamente se realizaban pruebas de toxicidad en la cepa control sin seleccionar. Mediante estas pruebas nos asegurábamos que la variación en la LC<sub>50</sub> y pendiente no se debía a una degradación de las ICPs.

**Tabla 3. Comparación de las diferentes modalidades de selección realizadas.**

Variables en el procedimiento	Agente Selectivo	
	ICP Pura	Myx-03604
Administración del agente selectivo	Dieta Artificial	Hojas de Col
Duración de la exposición	4 días	2 días
Nº de Larvas	Conocido	Desconocido
Estadio de las Larvas	Tercer Estadio	Primer Estadio

### 3.2.- Selección con MYX-03604

La selección con el producto Myx-03604 se realizó mediante hojas de col y con larvas de primer estadio (recién nacidas) (tabla 3). Dos hojas de col enteras se sumergían en una dilución de agua de este producto, durante 5 segundos y después se dejaba secar durante dos horas a 21°C. La concentración utilizada era la LC<sub>50</sub> (o cercana a ella) de la población para dicho producto. Transcurridos dos días de exposición de las larvas y Myx-03604, se añadían hojas frescas sin tratar y se llevaba las larvas hasta adultos, que serían los padres de la siguiente generación.

En este caso el número de larvas que se sometían a presión de selección era desconocido debido a lo difícil que resultaba contar larvas de tan pequeño tamaño. Además, en este caso nos interesaba someter a selección al mayor número posible de larvas. El motivo por el cual la selección con toxinas puras no se realizó del mismo modo fue por el gasto tan enorme de producto que suponía este método.

Al igual que en la selección con las ICPs puras, periódicamente se realizaban ensayos de toxicidad en la cepa seleccionada para ver el aumento en los valores de LC<sub>50</sub> y pendiente, y en la control para comprobar el estado del producto utilizado.

### 3.3.- Estima de la heredabilidad conseguida.

La estima de la heredabilidad conseguida ( $h^2$ ) se realizó según el modelo descrito por Tabashnik en 1992. Para ello es necesario conocer las LC<sub>50</sub>, las pendientes de las rectas de regresión y la mortalidad causada por la selección. De manera que:

$$h^2 = R/S$$

donde  $R$  es la respuesta a la selección y  $S$  es el diferencial de selección (Hartl, 1988; Falconer, 1996).

La respuesta de la selección  $R$ , es decir, la diferencia en el fenotipo medio entre la descendencia de los individuos seleccionados y la generación parental antes de la selección se estimó como:

$$R = \{\log(\text{LC50 final}) - \log(\text{LC50 inicial})\}/n$$

donde  $n$  es el número de generaciones transcurridas entre la generación inicial y final.

El diferencial de selección ( $S$ ), es decir, la diferencia en el fenotipo medio entre los padres seleccionados y la generación parental completa, se estimó como:

$$S = i\sigma_p$$

donde  $i$  es la intensidad de selección y  $\sigma_p$  es la desviación estándar fenotípica. La intensidad de selección ( $i$ ) se estimó a partir de  $p$  (porcentaje de supervivientes de la selección), usando las tablas del Apéndice de Falconer (1996). La desviación estándar fenotípica  $\sigma_p$  se estimó como:

$$\sigma_p = \{1/2 (\text{pendiente inicial} + \text{pendiente final})\}^{-1}$$

## 4.- MUTAGÉNESIS

### 4.1.- Agente mutágeno

El mutágeno utilizado fue el metanosulfonato de etilo (EMS), un potente agente alquilante que forma parte del grupo de los alquil-alcanosulfonatos.

El EMS provoca mutaciones puntuales a lo largo de todo el genoma actuando sólo sobre células postmeióticas (Jenkins, 1967).

Se estima que la frecuencia de mutación es 1/1000, es decir, de 200 a 1000 veces mayor que la frecuencia de genes de la resistencia en la naturaleza. Para la especie *Drosophila melanogaster* ( $10^{-6}$  -  $10^{-7}$ )

### 4.2.- Técnica de administración del mutágeno

Se realizó un experimento en el cual de 25 a 30 machos de *P. xylostella* eran sometidos a mutagénesis mediante EMS.

Se separaron machos jóvenes y se introdujeron en una caja de madera de dimensiones (24 x 20 x 24 cm) en cuyo interior se encontraba una placa de Petri. En dicha placa se colocaba un algodón empapado con una solución de EMS y agua con miel al 10% en la proporción 5µl : 1500µl respectivamente.

Después de 2 días de exposición al mutágeno, los individuos fueron recogidos mediante un aspirador e introducidos a una nueva caja de población junto con unas 50 hembras. Tres generaciones después de la mutagénesis se realizó un bioensayo, para obtener la  $LC_{50}$  y la pendiente de esta nueva línea mutagenizada. Posteriormente se inició la selección.



## 5.- ANÁLISIS DEL TIPO DE HERENCIA DE LA RESISTENCIA DE *Plutella xylostella* FRENTE A *Bacillus thuringiensis*.

Para conocer el tipo herencia de la resistencia se realizaron una serie de cruces entre la cepa resistente y la cepa sensible. Para ello se aislaron individualmente pupas una a una y una vez emergidos los adultos se procedió a la determinación del sexo. Esta identificación se realizaba observando la genitalia del insecto, situada en la parte final del abdomen (fig ). El objeto de separar las pupas fue la obtención de hembras vírgenes.

Se realizaron dos tipos de cruces diferentes: con una sola pareja o con varias parejas, en una misma jaula de apareamiento. De cada de cruce se realizaron varias repeticiones. Los cruces realizados fueron: macho R x hembra S y macho S x hembra R. Con las F<sub>1</sub> de los cruces se realizaron ensayos de toxicidad.

Calculamos  $h$ , la dominancia aproximada de la resistencia, como  $h = (w_{12} - w_{22}) / (w_{11} - w_{22})$ , donde  $w_{11}$ ,  $w_{12}$  y  $w_{22}$  son las eficacias biológicas para una toxina a una determinada concentración de homocigotos resistentes, heterocigotos y homocigotos susceptibles respectivamente. La eficacia de los homocigotos resistentes se define como 1. Estimamos el valor de la eficacia biológica de los heterocigotos tratados con cada toxina ( $w_{12}$ ) como la supervivencia de la progenie F<sub>1</sub> tratada dividida por la supervivencia de las larvas resistentes tratadas. La estima de la eficacia biológica de los homocigotos susceptibles se define como la supervivencia de las larvas susceptibles tratadas dividida por la supervivencia de las larvas resistentes tratadas. En cada caso, el primer paso es estimar la mortalidad que causa cada toxina ajustando la mortalidad del control como mortalidad total usando la corrección de Abbott (1925). La supervivencia se estima como un 100%. El rango de valores que puede presentar  $h$  va de 0 (completamente recesiva) a 1 (completamente dominante) (Hartl, 1992).

## **7.- TÉCNICAS GENERALES EMPLEADAS**

### **7.1.- Purificación de ICPs.**

A partir de la suspensión acuosa de los cuerpos de inclusión proporcionados por el laboratorio de Luke Masson (Montreal, Canadá, se inició un proceso de purificación de las ICPs. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

#### **7.1.1.- Solubilización.**

Los cuerpos de inclusión se centrifugaron a 14.000g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante (agua). El precipitado obtenido se resuspendió en tampón carbonato (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mM DTT/HCl, pH 10) durante dos horas a 37°C con agitación constante. La concentración se ajustó para obtener una concentración máxima de proteínas (protoxinas) de 3 mg/ml, puesto que a concentraciones superiores se corría el riesgo de pérdidas importantes por solubilización parcial.

#### **7.1.2.- Activación.**

Una vez solubilizadas las proteínas se activaban mediante tratamiento con tripsina tipo XI, de pancreas bovino (Sigma) a una proporción 1:10 es decir, 1 mg de tripsina por 10 mg de ICP. La activación se realizaba a 37°C, en agitación y durante toda la noche.

Para eliminar los lípidos que pudieran quedar de las membranas de E.coli adheridas a los cuerpos de inclusión se realizó una centrifugación a altas revoluciones (ultracentrífuga). El rotor utilizado fue un TVL-100 para tubos verticales a una velocidad de 122.000g durante una hora. Las membranas y demás restos celulares precipitaban y las proteínas (toxinas) quedaban disueltas en el sobrenadante.

Este sobrenadante se utilizaba en experimentos en los que no se requería un alto grado de pureza en la proteínas (ensayos de toxicidad). Si el experimento requería mayor pureza era necesario seguir con el protocolo de purificación.

### 7.1.3.- Separación cromatográfica.

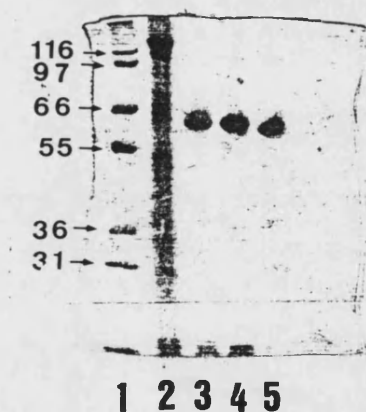
Todas las proteínas Cry1A eluyeron entre el 0.25 y 0.30 M de NaCl.

Los fragmentos obtenidos presentaban un peso molecular de 66 kD.

El rendimiento obtenido en los procesos de purificación no fue superior al 10% en ninguno de las tres toxinas.

Para completar la purificación de la toxina se utilizó la cromatografía rápida de intercambio iónico FPLC (Fast pression liquid chromatography), con la columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) equilibrada en tampón A (Tris-HCl 20mN, pH8.6). La elución se realizó mediante el gradiente lineal 0-60% de tampón B (Tris-HCl 20mN, 1M NaCl, pH 8.6) en 30 minutos.

Antes de ser pinchado el sobrenadante resultante de la ultracentrifugación, se cambió el tampón en el que estaba disuelta la toxina. El tampón carbonato fue sustituido por el tampón que se iba a utilizar en la FPLC es decir, el tampón A. Esta sustitución se realizó mediante columnas de Sephadex G25 de 1ml de lecho previamente equilibradas con el tampón A.



**Figura 5:** Electroforesis SDS-PAGE de los fragmentos obtenidos tras la tripsinización de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.

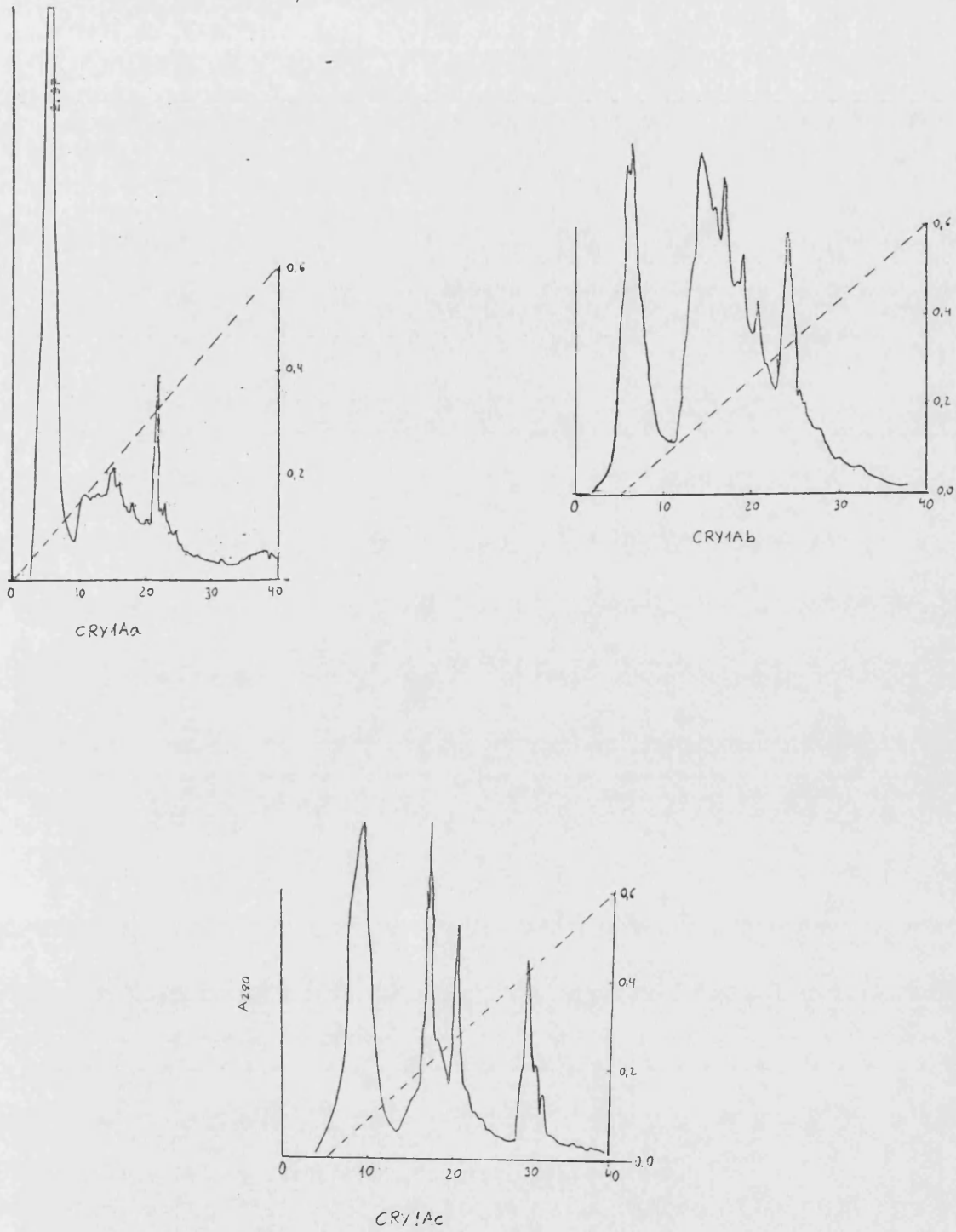
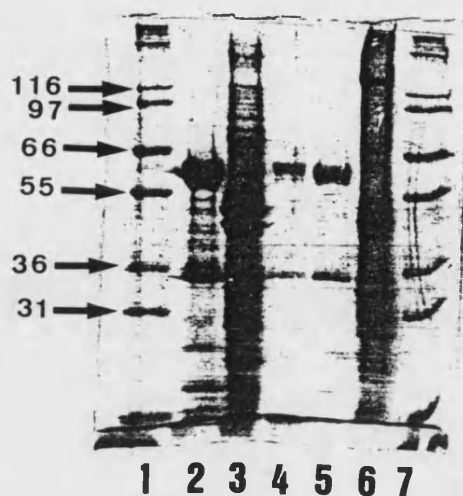


Figura 6: Perfil cromatográfico de la elución tras la digestión con tripsina de las toxinas del grupo Cry1A.



**Figura 7: Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la elución de la cromatografía tras la digestión con tripsina de las toxinas del grupo Cry1A.**

Una vez finalizado el cambio de tampón, la muestra se filtraba con un filtro de 0.22 $\mu$ m (Millipore) para evitar introducir en la columna impurezas. Después del filtrado la muestra ya estaba lista para ser inyectada en la columna.

**Tabla 4. El programa de separación mediante FPLC.**

Tiempo (min)	Volumen (ml)	% Tampón A	% Tampón B	Función
0	0	100	0	Equilibrado
0	0	100	0	Flujo constante
0.1	0.1	Pausa		Inyección
2	2	100	0	Lavado
32	32	40	60	Gradiente
32	32	0	100	Lavado
34	34	100	0	Re-equilibrado
40	40	100	0	Fin

Mediante un colector (RediFrac de Pharmacia) se recogían las fracciones y se medían las absorbancias a 280nm (L-4250 de Merck). El cromatograma se registró en un integrador Spectra Physics SP4290. Se realizaban electroforesis SDS-PAGE para comprobar en que fracciones aparecía la toxina como única banda, y posteriormente cuantificación de la toxina para conocer el rendimiento obtenido. El programa de separación mediante FPLC se muestra en la tabla 4.

## **7.2.- Cuantificación de proteínas.**

En algunas experiencias, como por la purificación de proteínas, era necesario conocer la cantidad de proteína que teníamos en solución. Para ello se siguió el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo del Kit de BioRad (Richmond, EE.UU.) como indicador de color. La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante la comparación de los valores de absorbancia obtenidos a 595 nm de la solución desconocida con los de una serie de diluciones de concentración conocida de BSA (albúmina de suero bovino).

## **7.3.- Electroforesis de proteínas.**

Se realizaron electroforesis de proteínas siguiendo el protocolo habitual (Laemmili, 1970) utilizando la técnica de electroforesis desnaturizante en poliacrilamida en la que la muestra era hervida junto con el tampón de muestra (0.1% azul de bromofenol, 5mM EDTA, 200mM TRis-HCL pH8.6 y sacarosa 1M), 100mM DTT y 4% SDS durante 5 minutos. De este modo las proteínas se separaban en bandas en base de su peso molecular.

En los geles se utilizaron concentraciones de acrilamida del 10% y del 5%. Siempre se empleaba una carrera con marcadores de peso molecular patrón como referencia.

Las electroforesis se realizaron tanto a 4°C como a temperatura ambiente y a, 35 mA hasta que se observaba la salida del frente por el final del gel.

Las bandas que aparecían en los geles se visualizaban mediante una tinción con Azul de Coomasie.

Finalmente los geles se secaban cubriéndolos con papel de celofán empapado en agua con glicerol al 10% y dejándolos sujetos en un marco durante toda la noche.

## 8.- PREPARACIÓN DE BBMV<sub>s</sub>.

Las BBMV<sub>s</sub> se prepararon según el protocolo descrito por Wolfersberger *et al* (1987), basándose en modificaciones de protocolos anteriores, principalmente del de Biber *et al* (1981), en los que las BBMV<sub>s</sub> se aíslan por precipitación diferencial mediante MgCl<sub>2</sub>.

Las BBMV<sub>s</sub> se prepararon a partir de insectos enteros de *P.xylostella*. (Escriche *et al* 1994). Los insectos eran homogeneizados mediante un homogeneizador de cuchillas a 8000 r.p.m., en 9 volúmenes de tampón MET (manitol 0.3M, EGTA 5 mM, Tris-HCL 17 mM, pH7.5). Posteriormente se añadió 1 volumen de MgCl<sub>2</sub> , dejando reposar la mezcla durante 15 minutos sobre hielo. Transcurrido ese espacio de tiempo, se realizaba una centrifugación a 1600g 15 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante era nuevamente centrifugado pero a 20000g durante 30 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendía en la mitad del volumen inicial de MET y se volvía a añadir un volumen igual de MgCl<sub>2</sub>. Después de esto el protocolo se repetía entero una vez mas, pero esta vez el precipitado de la segunda centrifugación era resuspendido en MET diluido al 50% con agua destilada y distribuido en pequeños tubos que se congelaban con N<sub>2</sub> líquido y se guardaban a -80°C hasta su utilización.

Normalmente al preparar BBMV<sub>s</sub> se partía de 1300 larvas de *P.xylostella* que pesaban alrededor de 6 gramos, obteniéndose un rendimiento final de 0.20 mg de proteína total por gramo de insecto.

## 9.- MARCAJE DE CRY1Ab Y CRY1Ac CON Na<sup>125</sup>I.

Los reactivos generales que se utilizaron fueron de grado analítico, y se obtuvieron de las casas comerciales habituales. El compuesto radiactivo de I<sup>125</sup>[NaI] proviene de Amersham (Buckinghamshire, R.U.). El reactivo catalizador del marcaje fue la cloramina T (Sigma Chemical Co., St Louis, EE.UU.)

El primer marcaje realizado fue el de la Cry1Ac y posteriormente el de Cry1Ab.

En el caso de Cry1Ab se procedió del mismo modo.

Una vez conocida la actividad específica de las  $^{125}\text{I}$ -ICP, se determinaron las condiciones en las que se debían realizar los experimentos de unión receptor-ligando. Mediante estos experimentos se determinaron los parámetros  $K_d$  y  $R_t$  y se caracterizó el sistema de receptores para *P.xylostella*.

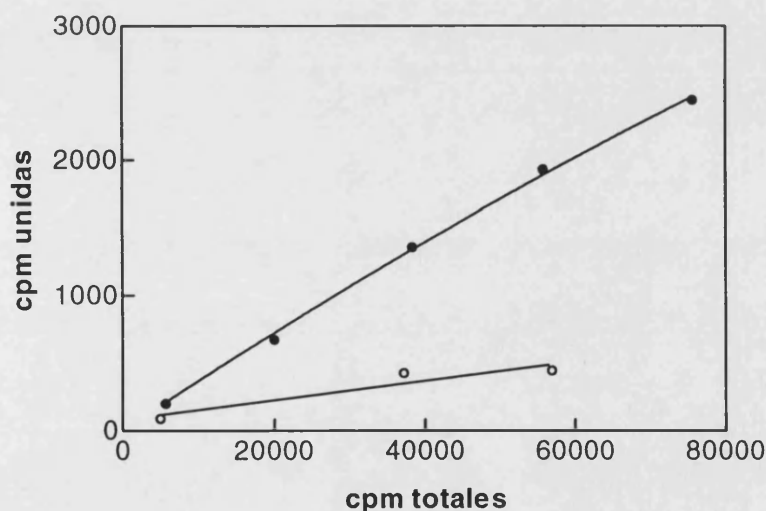
Las condiciones del ensayo fueron:

1.- Tiempo de reacción del experimento.

La determinación del tiempo de reacción de los experimentos se tomó de referencias anteriores y fue de 30 minutos (Ferré *et al*, 1991, Ballester *et al*, 1994).

2.- Determinación de la concentración de ICP marcada.

Mediante experimentos de desplazamiento (fig 8) se determinaron las concentraciones óptimas de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac. La concentración escogida estaba en el tramo lineal y fue de 10.000 cpm para  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab y de 40.000 cpm para  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac.



**Fig 8. Ensayos de unión realizados para conocer la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab a usar.**

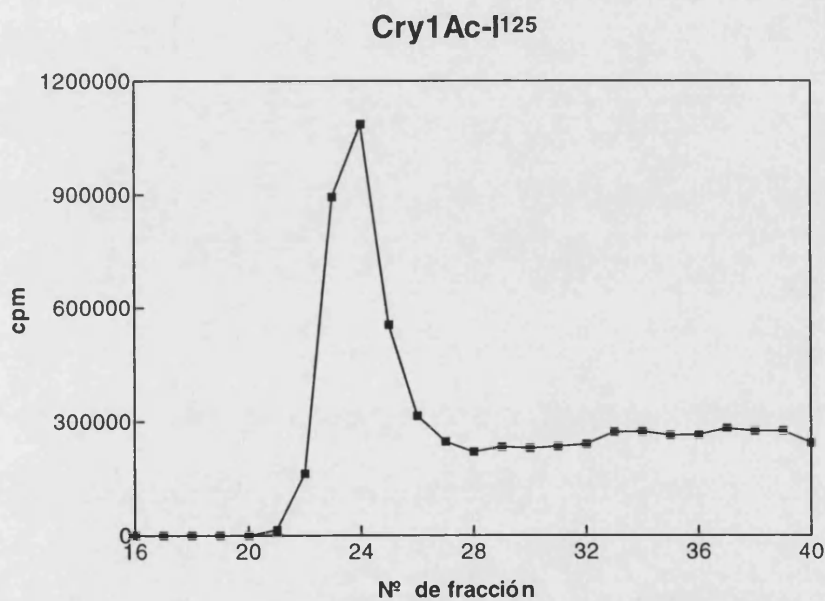
El marcaje radiactivo de las ICPs consiste en la adquisición de yodo por parte de las proteínas mediante reacciones de oxidación en aminoácidos determinados tales como la histidina y tirosina. El hecho de que una proteína tenga mayor o menor número de estos aminoácidos supondrá un mejor o peor marcaje.



El marcaje de las ICPs activadas se llevó a cabo siguiendo el protocolo de la cloramina-T descrito por Van Rie *et al* (1989).

En el vial donde se encontraban 5µl de NaI[I]<sup>125</sup> (0.5 mCi), se añadían por orden todos los componentes de la reacción: 13µl de cloramina-T (5mg/ml en PBS) que supone un 30% del volumen final y 25µl de toxina. Esta reacción se dejaba durante 30 segundos y una vez transcurridos se paraba añadiendo el 25 % del volumen total de metabisulfito de sodio en agua (23mM) y el 25% de NaI (1M).

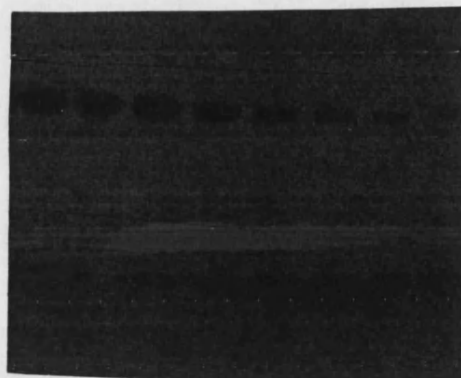
Una vez parada la reacción se inyectó todo el volumen en una columna de 1.7 cm x 18 cm de BioGel P-30 (BioRad), que previamente había sido desgasificada, para eliminar todo el yodo libre y se eluyó con el mismo tampón de equilibrado (20mN Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 8.6) con 0.1% de BSA (Fig 9).



**Fig 9: Elución de las fracciones recogidas tras el marcaje con <sup>125</sup>I-ICP**

Las fracciones eluidas se recogieron mediante un colector de fracciones (10 gotas / fracción) y posteriormente se midieron con un contador gamma (Compugamma 1282, LKB). Con las fracciones de interés se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS-PAGE 10% y una vez seco el gel se ponía en contacto con una placa fotográfica X-Omat S Film 100 de Kodak (Francia), dentro de

un estuche intensificador Kodak y se revelaba con una máquina automática (Fig 10). Las fracciones que mostraron una sola banda se guardaron en contenedores de plomo a 4°C.



**Fig 10. Electroforesis de las fracciones recogidas tras el marcaje.**

#### **10.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE $^{125}\text{I}$ -ICP.**

La determinación de la actividad específica de las ICPs marcadas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Van Rie *et al.* (1989), que consiste en la realización de un ensayo ELISA de tipo sandwich. A una placa de multipocillos se le unió un anticuerpo policlonal contra la ICP. Seguidamente se incubaba con diluciones de ICP que eran reconocidas y unidas a la placa. Una vez unida la ICP se completaba el “sandwich” con un anticuerpo monoclonal. Estos últimos anticuerpos son a la vez diana de otros anticuerpos que llevan conjugado un enzima que es la fosfatasa alcalina (Sigma). Como sustrato de la fosfatasa alcalina 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.

Comparando con los niveles de absorbancia obtenidos de diluciones de la ICP marcada con una escala con concentraciones conocidas de ICP, es posible determinar la concentración de la ICP marcada y por tanto la actividad específica. Las actividades

específicas de los marcajes realizados fueron 1.8 mCi/mg para la Cry1Ab y 2.1 mCi/mg para la Cry1Ac

## 11.- DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LOS ENSAYOS DE UNIÓN $^{125}\text{I}$ -ICP-RECEPTOR.

Para determinar los parámetros bioquímicos de la unión de las ICPs a sitios en la membrana, se comprobó la radiactividad que quedaba unida a una concentración de BBMV después de ser incubada con  $^{125}\text{I}$ -ICP (Hofmann *et al* 1988).

Pero antes de iniciar un experimento era necesario poner a punto las condiciones a las que se realizarían los ensayos. El tiempo óptimo de unión fue la primera condición a tener en cuenta. En nuestro caso con *P.xylostella*, el tiempo de reacción fue tomado de Ferré *et al* 1991. Para el resto de las condiciones de reacción se hicieron pruebas con cada ICP marcada y con cada preparación diferente de BBMVs. Las pruebas consistían en incubar diferentes concentraciones de ICP marcada y de BBMVs bajo el mismo tiempo de reacción. Las condiciones óptimas elegidas correspondían a concentraciones en las que seguíamos en la parte línea de la hipérbola.

Una vez conocidas las condiciones de ensayo se realizaron pruebas de competencia, homólogas y heterólogas, entre ICP marcada y no marcada. De manera que se preparaba un tubo en el que por estricto orden se colocaban: tampón PBS/0.1% BSA, ICP no marcada,  $^{125}\text{I}$ -ICP y BBMV. El volumen final de la reacción era de 100 $\mu\text{l}$  y la reacción tenía lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Todas las muestras se incubaron por duplicado.

Transcurrido el tiempo necesario, la reacción se paraba filtrando la muestra por filtros de vidrio Whatman GF/F (Whatman Scientific limited, Maindstone, R.U.), que previamente eran incubados durante una hora con tampón PBS/0.5% BSA, y seguidamente se lavaban con 5ml de tampón PBS/0.1% BSA. La radiactividad que quedaba retenida en los filtros se contaba con un contador Gamma durante 2 minutos.

Los resultados de la unión al filtro se analizaron mediante el programa LIGAND (Munson y Rodbard, 1980) y a partir de ellos obtuvimos los valores de concentración de sitios de unión (Rt) y la constante de disociación (Kd).

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### 1.- TOXICIDAD DE LAS ICPs DE *Bacillus thuringiensis* FRENTE A DOS POBLACIONES DE *Plutella xylostella*.

#### 1.1.- Toxicidad de las ICPs purificadas.

Las pruebas de toxicidad realizadas sobre dieta artificial con larvas de la población susceptible de *P. xylostella* (Tabla 5, Fig. 11) pusieron de manifiesto que las ICPs más activas fueron Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B mientras que Cry1Aa, Cry1C y Cry1F resultaron ser menos activas. Además se observó que la ICP Cry1E no era efectiva ya que sólo resultaba tóxica a concentraciones muy elevadas. Los valores de las pendientes para todas la ICPs en la población susceptible del laboratorio fueron similares, salvo en el caso de Cry1Ab que fue ligeramente inferior.

**TABLA 5: Toxicidad de las ICP activadas en larvas de tercer estadio de *Plutella xylostella*. Los resultados son la media de dos repeticiones <sup>a</sup>**

ICP	Población susceptible		Población de Filipinas (BL2)	
	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> )	Pendiente (S.E.)	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> )	Pendiente (S.E.)
Cry1Aa	239 (127 - 1.045) <sup>b</sup>	1.60 (0.49)	310 (219 - 468)	1.94 (0.25)
Cry1Ab	15 (5 - 30)	1.29 (0.15)	3550 (1100 - 68000)	0.43 (0.14)
Cry1Ac	44 (29 - 99)	1.80 (0.38)	40 (23 - 68)	1.66 (0.25)
Cry1B	35 (15 - 81)	2.07 (0.23)	36 (11 - 68)	1.74 (0.38)
Cry1C	117 (68 - 210)	1.78 (0.21)	80 (56 - 130)	1.78 (0.31)
Cry1E	>1600		>1600	
Cry1F	362 (200 - 1100) <sup>b</sup>	1.99 (0.4)	212 (130 - 370)	1.95 (0.36)

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresa en ng de proteína/cm<sup>2</sup> de dieta artificial.

<sup>b</sup> Límites fiduciales al 95%

La población BL2 también se analizó mediante pruebas de toxicidad en dieta artificial, a partir de las cuales se calcularon las  $LC_{50}$  y las pendientes obtenidas para las diferentes ICPs (Tabla 5, Fig. 11). Esta población, al igual que la población BL1, presentó una alta resistencia a Cry1Ab (236 veces) mientras que para el resto de toxinas (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1E y Cry1F) no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones susceptible y resistente. Respecto a las pendientes, las diferencias encontradas en la población BL2 fueron similares a las encontradas en la población sensible, a excepción de Cry1Ab, que fue significativamente menor, lo que significaba un mayor grado de heterogeneidad entre los individuos de esa población.

### 1.2.- Toxicidad de los preparados comerciales de *B. thuringiensis*.

Posteriormente, se realizaron pruebas de toxicidad con preparados comerciales de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* como Dipel y Thuricide, utilizados en el campo, y con el producto Myx-03604 (híbrido entre Cry1Ab y Cry1Ac), todavía en fase experimental. Como puede observarse en la tabla 6 y figura 12 los valores de las  $LC_{50}$  y de las pendientes encontradas en la subpoblación BL2 para Dipel y Thuricide fueron comparables a las obtenidas en la población sensible.

**TABLA 6: Toxicidad de productos comerciales de *B. thuringiensis* en larvas de tercer estadio de *P. xylostella*.<sup>a</sup>**

ICP	Colonia de laboratorio		Colonia de Filipinas (BL2)	
	$LC_{50}$ (FL <sub>99</sub> )	Pendiente (S.E.)	$LC_{50}$ (FL <sub>99</sub> )	Pendiente (S.E.)
Thuricide	137 (70 - 275)	1.45 (0.21)	172 (70 - 452)	1.45 (0.17)
Dipel	320 (169 - 635)	1.08 (0.13)	118 (52 - 253)	1.16 (0.17)
Myx-03604	6.6 (N.D.) <sup>b</sup>	0.77 (0.31)	100 (36 - 274)	0.24 (0.12)

<sup>a</sup> Los valores de  $LC_{50}$  y los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresan como ingrediente activo/cm<sup>2</sup> de dieta artificial en el caso de Dipel y Thuricide y como nl de producto/ml de disolución en discos de hojas de col en el caso de Myx-03604.

<sup>b</sup> N.D. significa no determinado

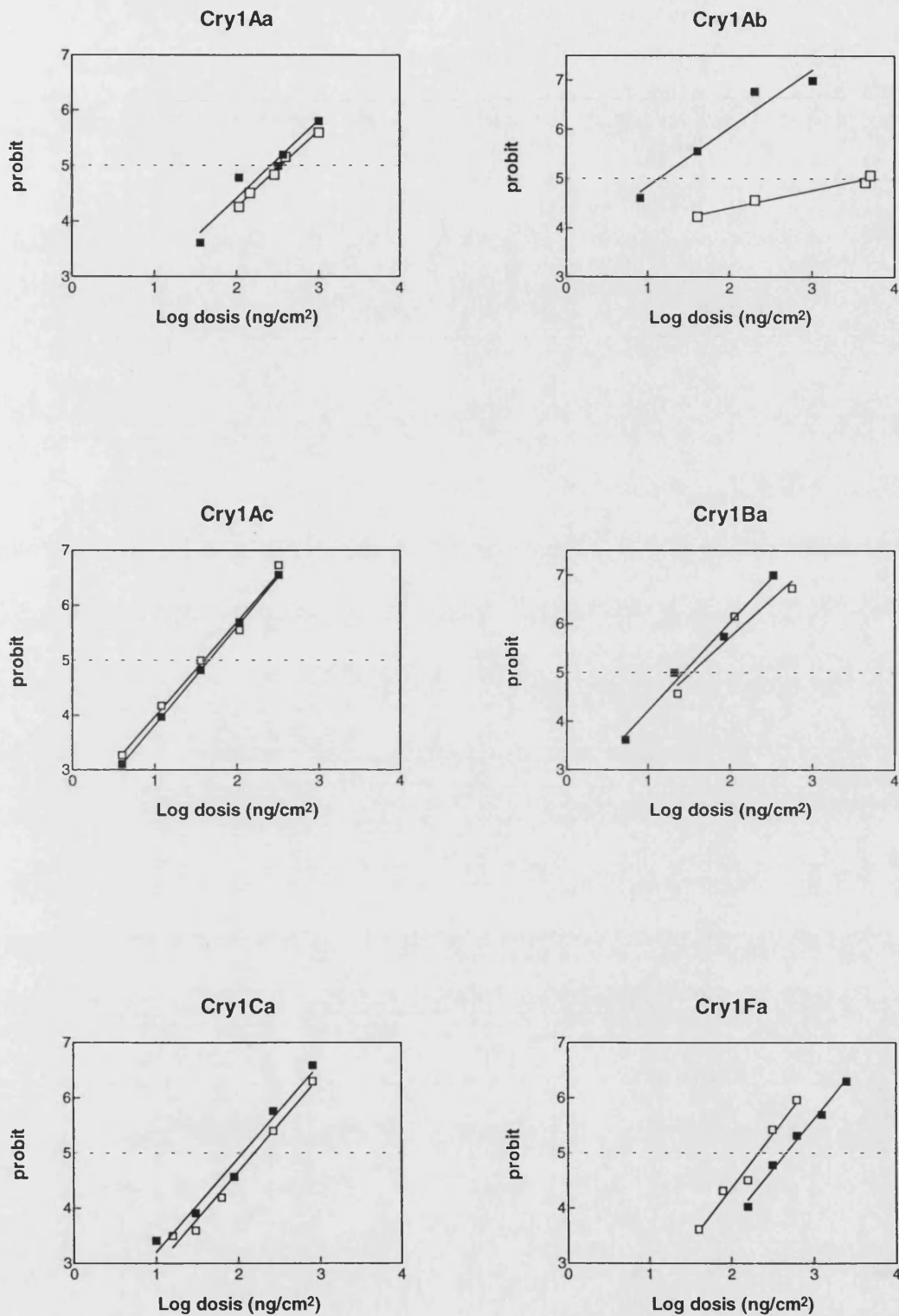
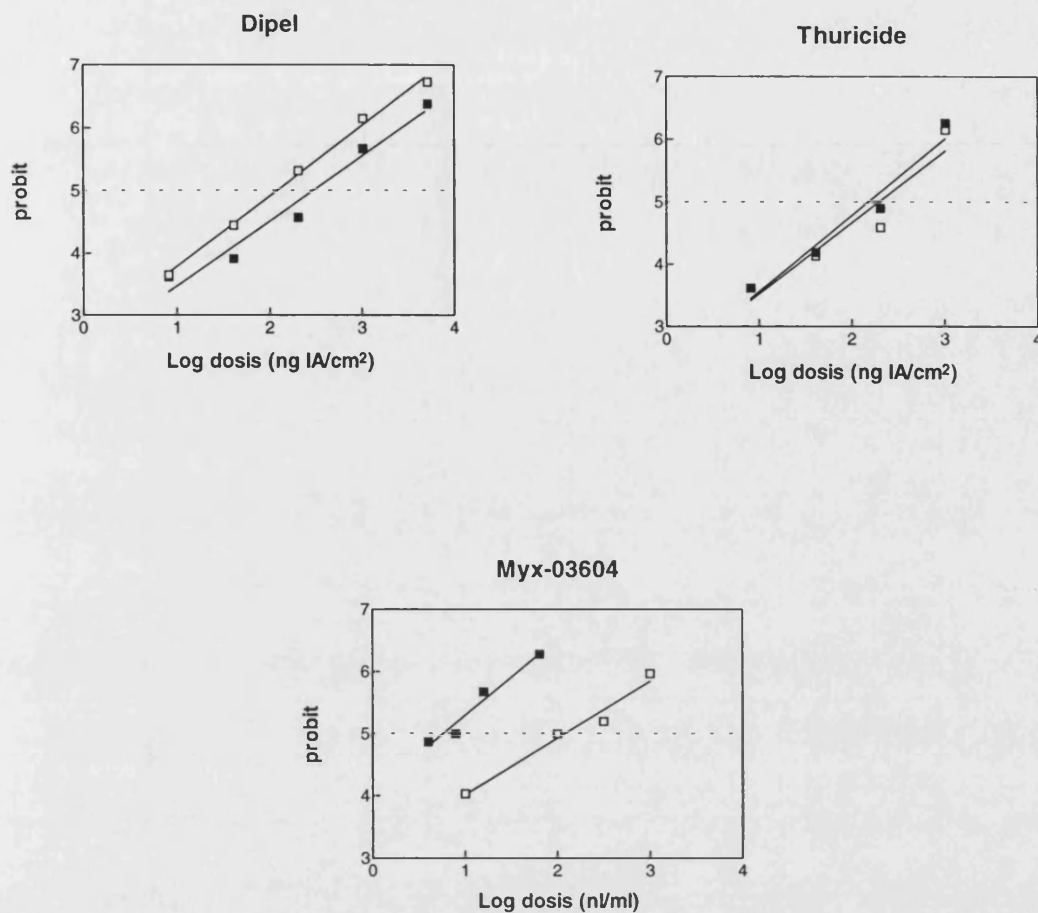


Fig 11 . Curvas de mortalidad obtenidas en los ensayos de toxicidad realizados en las poblaciones Susceptible (■) y BL2 (□) de *P.xylostella* frente a diferentes ICPs.



**Fig 12 . Curvas de mortalidad obtenidas en los ensayos de toxicidad realizados en las poblaciones Susceptible ( ) y BL2 ( ) de *P. xylostella* frente a los productos comerciales Dipel y Thuricide y frente al producto Myx-03604.**

Sin embargo, sí se observaron diferencias frente al producto Myx-03604, tanto en el valor de la  $LC_{50}$  (mostraba una resistencia de 15 veces frente a la sensible), como en el valor de la pendiente (3 veces). El hecho de que el valor de la pendiente resultara menor para Myx-03604 nos indica un mayor grado de heterogeneidad y por tanto, mayor capacidad de respuesta frente a una selección.

## **2.- EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE *Plutella xylostella* PARA DESARROLLAR RESISTENCIA FRENTE A ICPs DE *Bacillus thuringiensis*.**

Disponiendo de la población susceptible de laboratorio utilizada como control y de dos subpoblaciones resistentes a Cry1Ab procedentes de la población natural de



Filipinas, nos dispusimos a comprobar la capacidad de respuesta de *P.xylostella* a diferentes selecciones para desarrollar nuevas resistencias o a aumentar las ya existentes. para ello nos planteamos diferentes objetivos:

### 2.1.- Selección frente a la ICP Cry1Ab en la subpoblación BL1.

El primer objetivo consistía en conocer la capacidad de recuperación de niveles de resistencia originales de la población BL1, la cual, tras 20 generaciones en el laboratorio sin presión de selección, había perdido parte de su resistencia (6 veces respecto a la población susceptible) frente a Cry1Ab (Ferré et al., 1991). Para ello se realizó una selección con esta ICP mediante dieta artificial, tal y como se describe en el apartado 3.1 de material y métodos de este trabajo.

**TABLA 7. Proceso de selección realizado en la población BL1 con Cry1Ab.**

GENERACIÓN	DOSIS DE Cry1Ab <sup>1</sup>	Nº DE LARVAS <sup>2</sup>	% MORTALIDAD <sup>3</sup>
F1	620	638	60
F2	620	654	57.1
F3	620	400	56.4
F4	620	755	51.4
F5	620	778	40
F6	900	470	67.8
F7	900	1000	60
F8	900	812	67.8
F9	900	1112	62.7
F10	900	439	48.7

<sup>1</sup> La dosis de Cry1Ab utilizada para la selección era el valor de LC<sub>50</sub> que presentaba la línea seleccionada.

<sup>2</sup> Número de larvas a las que se le aplicaba la presión de selección.

<sup>3</sup> Mortalidad contabilizada a los 4 días.

Las presiones de selección que se aplicaban eran valores cercanos a las LC<sub>50</sub> de la población, pero nunca superior, para así disminuir el riesgo de su pérdida durante el proceso de selección y asegurarnos un tamaño poblacional estable. Después de 5 generaciones y como consecuencia de la disminución de la mortalidad frente a la dosis inicialmente utilizada, se aumentó la presión de selección (Tabla 7).

Tras 10 generaciones de selección los resultados obtenidos se comprobaron mediante el cálculo de la LC<sub>50</sub> y de los valores de las pendientes tras la realización de pruebas de toxicidad (tabla 8 y Fig 13).

**TABLA 8: Resultado de la selección realizada en la población BL1 con Cry1Ab.**

	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> ) <sup>a</sup>	Pendiente (S.E.) <sup>b</sup>
Antes de la selección (F <sub>0</sub> )	569 (221-3880)	1.21 (0.15)
Tras la selección (F <sub>10</sub> )	862 (394-1926)	1.13 (0.17)
Sin seleccionar <sup>c</sup> (F <sub>10</sub> )	142 (N.D.) <sup>d</sup>	0.96 (0.24)
Susceptible	15 (5-29)	1.29 (0.15)

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> y los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresa en ng de proteína/cm<sup>2</sup>.

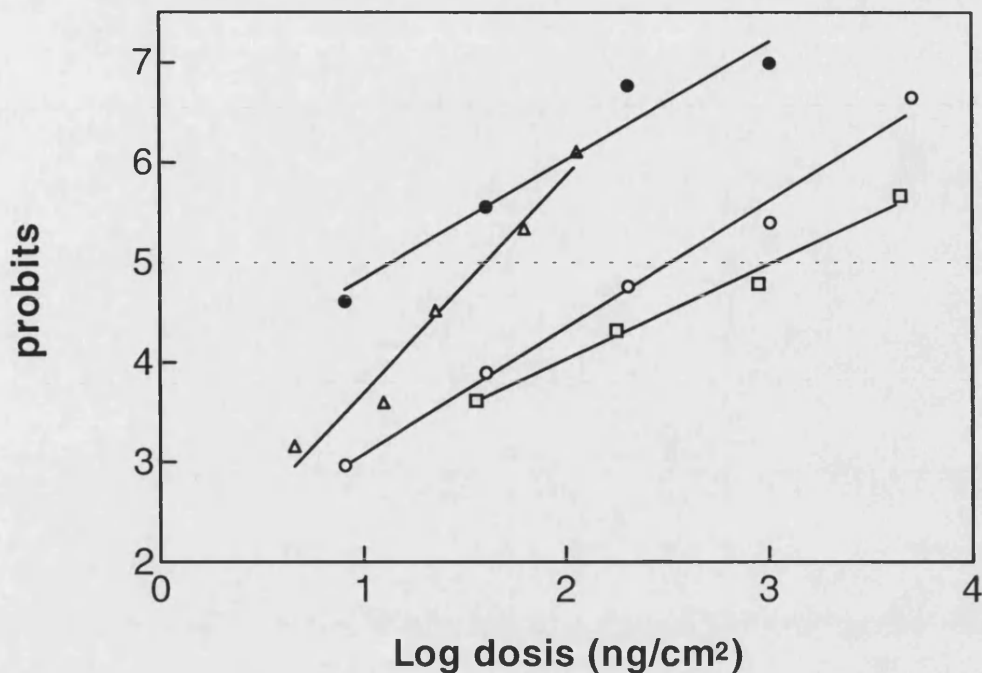
<sup>b</sup> Valores de la pendiente y del error estándar (S.E.).

<sup>c</sup> Valor de LC<sub>50</sub> de la línea no seleccionada de la población BL1 durante 10 generaciones.

<sup>d</sup> N.D. significa no determinado

A la vista de los resultados podemos decir que la selección no fue efectiva, ya que no se recuperaron los valores iniciales de LC<sub>50</sub> que presentaba la población tras su captura en la naturaleza (LC<sub>50</sub> >1350 ng/cm<sup>2</sup>). Tampoco se encontraron cambios significativos en los valores de las pendientes antes y después de la selección.

Sin embargo, el éxito principal de la selección fue el mantenimiento de los niveles de resistencia existentes, ya que la sublínea no seleccionada, mantenida como referencia, siguió disminuyendo su resistencia en un factor de 6 respecto de la sublínea seleccionada. De manera que, comparando las diferentes sublíneas, nos encontramos que la línea seleccionada con Cry1Ab presentaba un nivel de resistencia de 57 veces respecto al control mientras que en la línea no seleccionada este factor sólo fue de 9.



**Fig 13 . Curvas de mortalidad obtenidas en el experimento de selección realizado con Cry1Ab en la población BL1. Susceptible (●), BL1 antes de la selección (○), BL1 tras la selección (▲) y BL1 sin seleccionar (□).**

## 2.2.- Selección frente a Cry1B de la población BL1.

El segundo objetivo consistía en la realización de una línea paralela de selección en la población BL1 pero esta vez con Cry1B como agente selectivo. Esta selección nos permitiría conocer la capacidad de respuesta de la población BL1 frente a otra ICP distinta de Cry1Ab.

La tabla 9 nos muestra el procedimiento de selección y, al igual que en la realizada con Cry1Ab, para suministrar la ICP se usó dieta artificial. La presión selectiva fue cercana a la  $LC_{50}$  de la población para asegurarnos la obtención de una nueva generación. En los casos en los que no se disponía de este dato se estimaba aproximadamente a partir de las mortalidades obtenidas después de cada presión de selección.

TABLA 9. Proceso de selección realizado en la población BL1 con Cry1B.

GENERACIÓN	DOSIS DE Cry1B <sup>1</sup>	Nº DE LARVAS <sup>2</sup>	% MORTALIDAD <sup>3</sup>
F1	20	534	35.4
F2	20	629	33.7
F3	20	525	30.2
MUTAGÉNESIS			
F6	110	616	31.6
F7	110	693	12.6
F8	110	362	15.2

<sup>1</sup> Dosis de Cry1B utilizada como presión de selección

<sup>2</sup> Número de larvas a las que se le aplicaba la presión de selección.

<sup>3</sup> Valor de LC<sub>50</sub> de la población BL1 no seleccionada durante 8 generaciones.

Tras 3 generaciones de selección no se observó una disminución significativa de la mortalidad. El hecho de que la población BL1 permaneciera mucho tiempo en el laboratorio nos hizo suponer que la línea que estábamos seleccionando no disponía de la variabilidad genética necesaria para responder a esta nueva selección. Por ello realizamos una experiencia de mutagénesis con el mutágeno metanosulfonato de etilo sulfonato.

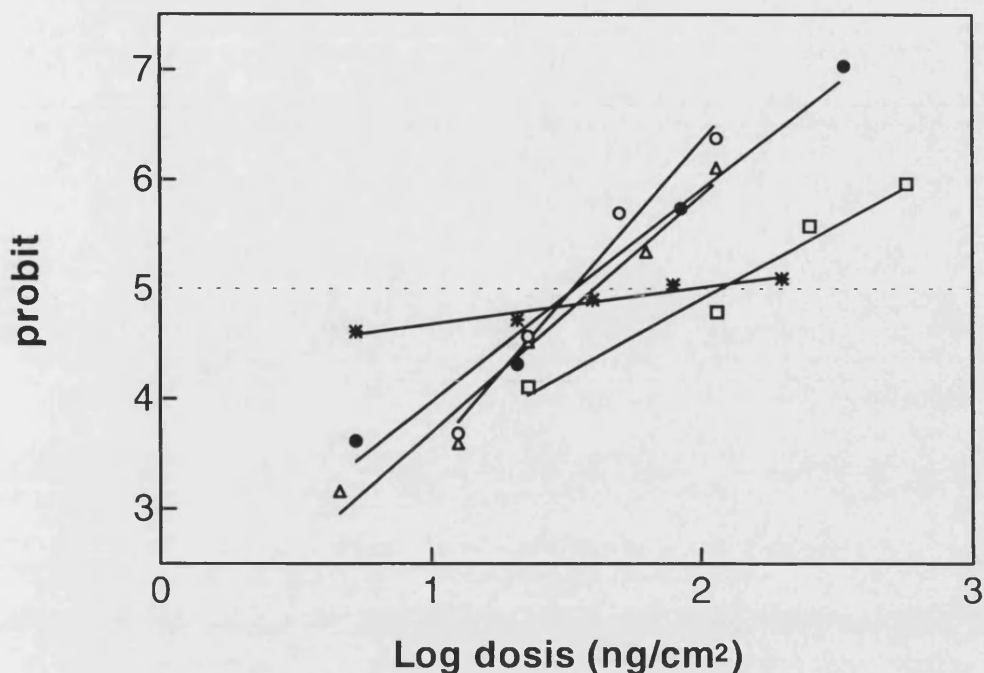
TABLA 10: Resultado de la selección realizada en la población BL1 con Cry1B.

	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> ) <sup>a</sup>	Pendiente (S.E.) <sup>b</sup>
Antes de la selección (F <sub>0</sub> )	35	2.8 (0.77)
Mutagénesis (F4)	114 (30-5139)	0.5 (0.13)
Tras la selección (F10)	122 (77-196)	1.67 (0.26)
Sin seleccionar <sup>c</sup> (F10)	36 (25-50)	2.20(0.24)
Susceptible	35 (15-81)	2.07 (0.23)

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> y los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresa en ng de proteína/cm<sup>2</sup>

<sup>b</sup> Valores de la pendiente y del error estándar (S.E.).

<sup>c</sup> Valor de LC<sub>50</sub> de la subpoblación BL1 no seleccionada durante 8 generaciones.



**Fig 14 . Curvas de mortalidad obtenidas en el experimento de selección realizado con Cry1Ba en la población BL1. Susceptible (●), BL1 antes de la selección (○), BL1 tras la mutagénesis (◊), BL1 tras la selección (◐), BL1 sin seleccionar (◑).**

Tras la mutagénesis, la línea de selección se mantuvo tres generaciones sin presión positiva con el fin de obtener el valor de la  $LC_{50}$  y un mayor número de individuos. El valor de la  $LC_{50}$  obtenido en la sexta generación fue tres veces superior al inicial. La mutagénesis realizada produjo un aumento en la variabilidad genética como indican los valores de las pendientes (tabla 10). Al iniciar la selección, el valor de la pendiente era comparable al de la población control pero significativamente mayor (9 veces) al obtenido tras la mutagénesis. Durante la selección, la pendiente fue aumentando su valor aunque sin llegar a los valores de partida. Esto nos indica que el resultado de la selección no se manifestaba como un gran aumento en el valor de la  $LC_{50}$ , ya que los niveles de resistencia frente a Cry1Ba en la línea seleccionada sólo aumentaron en un factor de 3 respecto a la cepa control, sino mas bien como una estabilización de la resistencia obtenida tras la mutagénesis. Como puede observarse, la línea no seleccionada mantuvo los niveles iniciales de toxicidad frente a Cry1Ba.

La selección con Cry1Ba nos ha confirmado esta falta de variabilidad en BL1 para responder a una selección frente a diferentes agentes selectivos.

### 2.3.- Evaluación de resistencias cruzadas entre las familias Cry1A y Cry1B en la subpoblación BL1.

El tercer objetivo suponía la evaluación de la resistencia cruzada, observada en las dos líneas de selección anteriormente descritas.

#### 2.3.1.- Evaluación de resistencia cruzada para Cry1Ba en la línea seleccionada con Cry1Ab.

El aumento de resistencia frente a Cry1Ba en la línea seleccionada con Cry1Ab fue, como muestran los valores de  $LC_{50}$ , dos veces superior respecto a la línea no seleccionada aunque esta diferencia no puede considerarse significativa considerando los límites fiduciales. Además los valores de las pendientes antes y después de la selección son iguales (tabla 11).

**Tabla 10. Tabla de toxicidades frente a Cry1B en la línea seleccionada con Cry1Ab.**

	$LC_{50}$ (FL <sub>99</sub> ) <sup>a</sup>	Pendiente (S.E.) <sup>b</sup>
Antes de la selección	35	2.8 (0.77)
Después de la selección	68 (33-153)	2.30 (0.22)

<sup>a</sup> Los valores de  $LC_{50}$  y los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban en ng de proteína/cm<sup>2</sup>

<sup>b</sup> Valores de la pendiente y del error estándar (S.E.).

#### 2.3.2.- Evaluación de resistencia cruzada para Cry1Ab en la línea seleccionada con Cry1Ba.

Tampoco en este caso se encontraron diferencias significativas entre los valores de  $LC_{50}$  antes y después de la selección con Cry1Ba (tabla 12), lo que indicaba que el nivel de resistencia inicial era el mismo que al final. Por lo que podemos decir que la selección únicamente mantuvo los niveles de resistencia presentes inicialmente en la población.

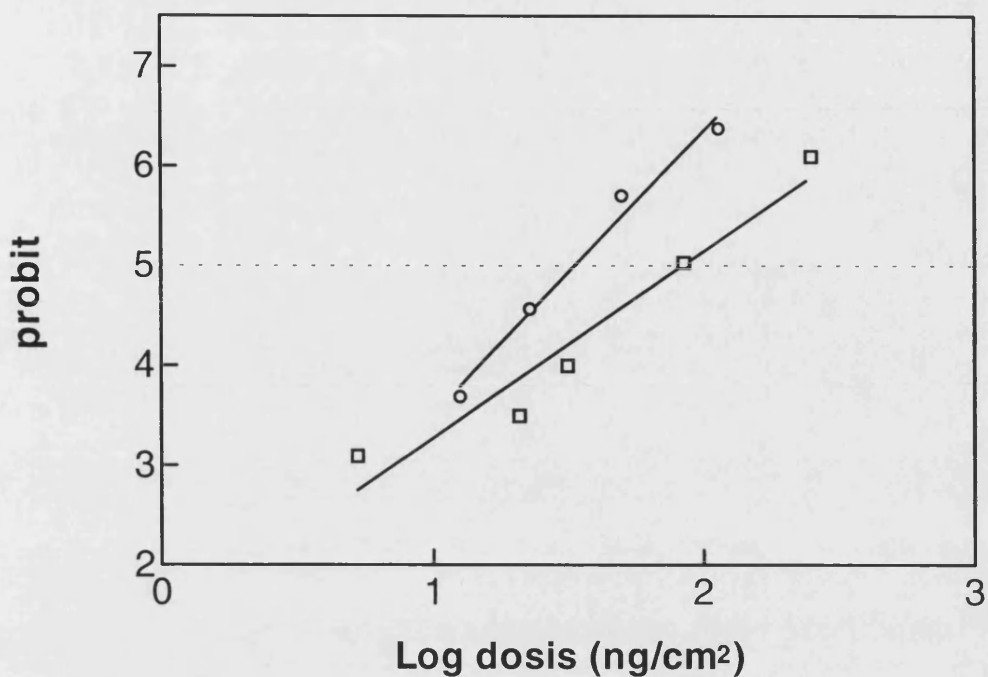


Fig 15. Evaluación de la generación de resistencia cruzada a Cry1Ba en la población BL1 seleccionada con Cry1Ab. BL1 antes de la selección (O), BL1 tras la selección.

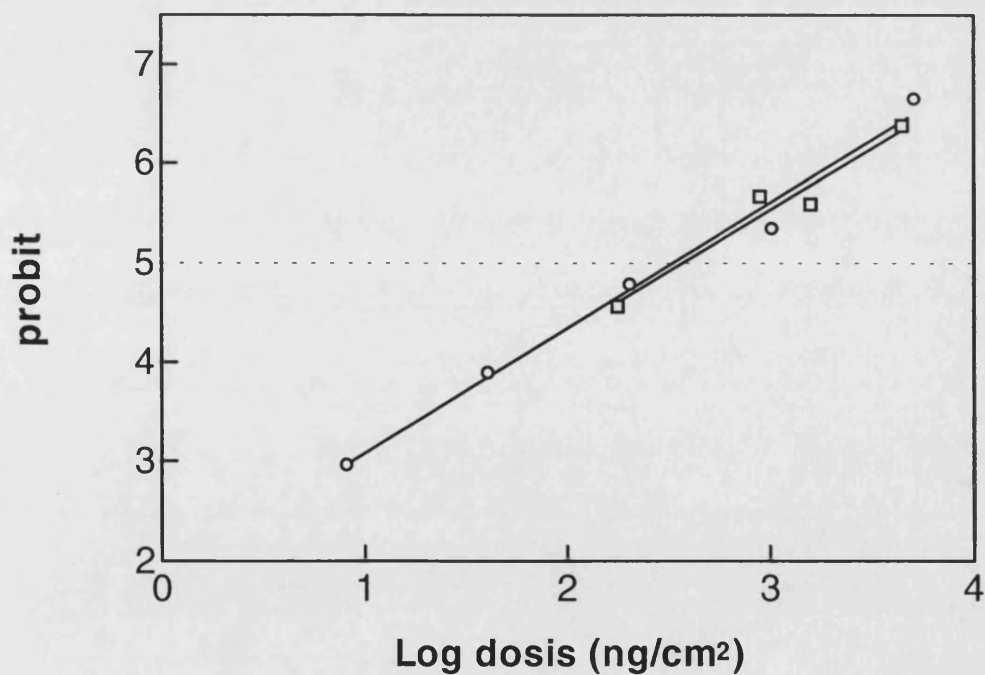


Fig 16. Evaluación de la generación de resistencia cruzada a Cry1Ab en la población BL1 seleccionada con Cry1Ba. BL1 antes de la selección (O), BL1 tras la selección ( ).

**Tabla 12. Tabla de toxicidades frente a Cry1Ab en la línea seleccionada con Cry1B.**

	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> ) <sup>a</sup>	Pendiente (S.E.) <sup>b</sup>
Antes de la selección	569 (221-3880)	1.21(0.15)
Después de la selección	422 (151- 1154)	1.65 (0.36)

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> y los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban en ng de proteína/cm<sup>2</sup>

<sup>b</sup> Valores de la pendiente y del error estándar (S.E.).

#### 2.4.- Selección frente a Cry1Ab en la subpoblación BL2.

El cuarto objetivo consistía en conocer la respuesta que presentaba la subpoblación BL2 frente a la selección con Cry1Ab. El hecho de que la población se capturara de la naturaleza nos hacía suponer que presentaba la variabilidad genética necesaria para responder satisfactoriamente a una presión selectiva positiva. Esta selección se realizó mediante dieta artificial, tal y como se describe en el apartado 3. de material y métodos de este trabajo (tabla 12). Al igual que en la selecciones anteriores, las presiones selectivas fueron cercanos a los valores de LC<sub>50</sub> de las líneas seleccionadas obtenidos a partir de pruebas de toxicidad.

**TABLA 12: Proceso de selección mediante la toxina Cry1Ab en la cepa resistente de *P.xylostella* procedente de Filipinas (BL2).**

Generación	Dosis de Cry1Ab (ng/cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	No. de larvas <sup>2</sup>	% Mortalidad <sup>3</sup>
F1	1000	660	59.5
F3	3500	456	52.8

<sup>1</sup> Dosis de Cry1Ab utilizada como presión de selección

<sup>2</sup> Número de larvas a las que se le aplicaba la presión de selección.

<sup>3</sup> Mortalidad contabilizada a los 4 días.

Después de dos generaciones de selección con Cry1Ab (Tabla 13), se observó un importante incremento en la resistencia de Cry1Ab y Myx-03604 de manera que las LC<sub>50</sub> aumentaron 15 y 9 veces respectivamente frente al valor de LC<sub>50</sub> al inicio de la selección.



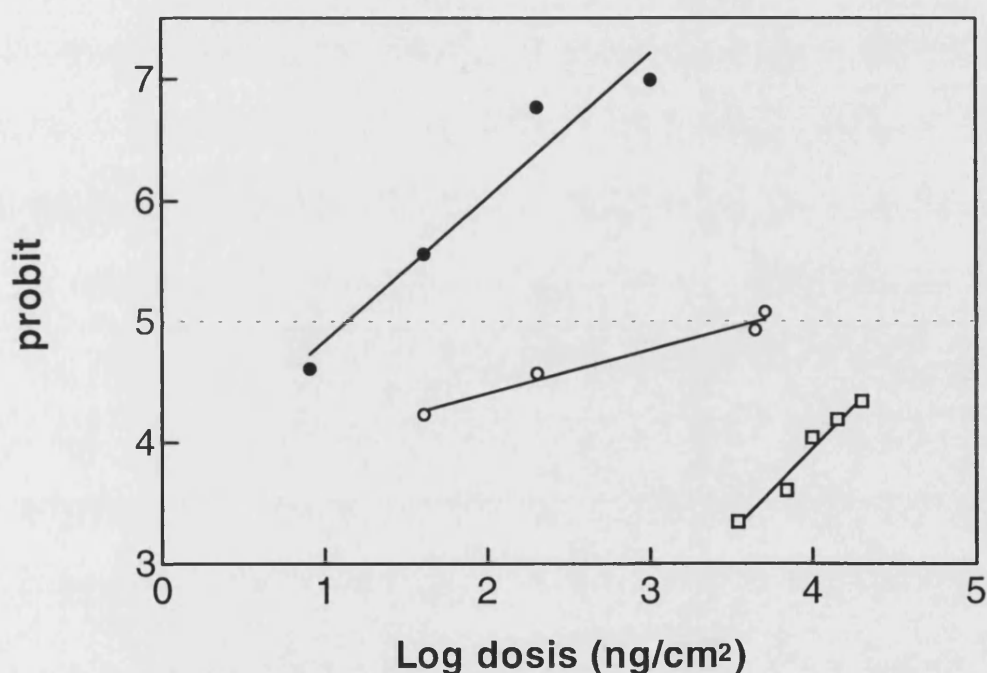
**TABLA 13: Toxicidad de las ICPs activadas y de Myx-03604 en larvas de tercer estadio de *P.xylostella* antes y después de la selección con Cry1Ab. <sup>a</sup>**

ICP	Población susceptible	Población de Filipinas (BL2) <sup>b</sup>	
		Antes de la selección	Después de la selección
Cry1Ab	15 (5 - 30)	3,550(1100- 68,000) [236]	52,000 [3467]
Myx-03604	6.6	100 (36 - 274) [15]	880 (203 - 5060) [133]

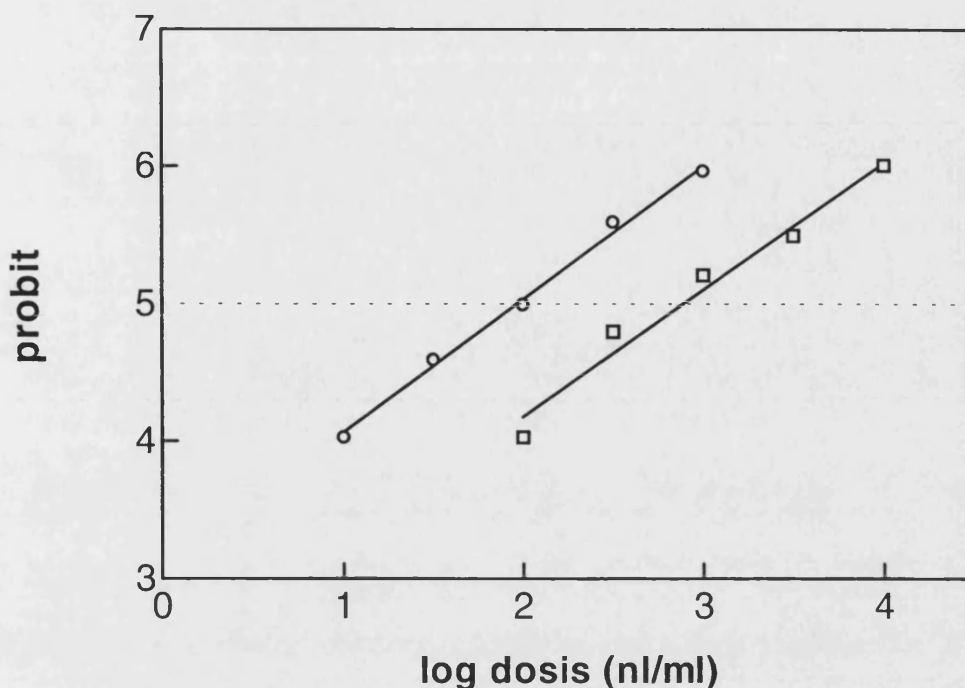
<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban en ng de proteína/cm<sup>2</sup> de dieta artificial en el caso de las ICPs puras y como nl de producto/ml de agua en discos de hojas de col en el caso de Myx-03604.

<sup>b</sup> Resistencia relativa expresado entre llaves, se obtenía dividiendo el valor de LC<sub>50</sub> de la cepa de Filipinas entre la LC<sub>50</sub> de la cepa control.

<sup>c</sup> Límites fiduciales al 95%



**Fig 17. Curvas de mortalidad obtenidas en el experimento de selección realizado con Cry1Ab en la población BL2. Susceptible (●), BL2 antes de la selección (○), BL2 tras la selección (□).**



**Fig 18 . Evaluación de la generación de resistencia cruzada a Myx-03604 en la población BL2 seleccionada con Cry1Ab. BL2 antes de la selección (●), BL2 tras la selección (◻).**

Tras la tercera presión de selección, la línea seleccionada se perdió por lo que se procedió a la reanudación de una nueva selección a partir de la línea que se mantuvo paralelamente sin seleccionar. Pero a pesar de que se realizaron presiones de selección de  $3500 \text{ ng/cm}^2$  ( $LC_{50}$  de la línea no seleccionada) durante varias generaciones, no se obtuvo respuesta.

### 2.5.- Selección frente a Myx-03604 en la subpoblación BL2.

Para completar el estudio de las selecciones en el laboratorio con una población natural, decidimos seleccionar con el híbrido Myx-03604, frente al cual la subpoblación BL2 ya presentaba ciertos niveles de resistencia. La selección con Myx-03604 se realizó durante 10 generaciones mediante hojas tratadas tal y como se describe en el apartado 3.2 de material y métodos de este trabajo, (Tabla 14).

**TABLA 14: Resultado de la selección con Myx-03604 en larvas de tercer estadio de *P.xylostella* procedente de Filipinas. <sup>a</sup>**

Generación de selección	Presión de selección (nl / ml)	LC 50% (FL <sub>99</sub> ) <sup>b</sup>	Pendiente (S.E.)	Resistencia relativa <sup>c</sup>
F0	----	100 (36 - 274)	1.12 (0.24)	15
F1	50	278 (160 - 719)	2.45 (0.82)	42
F2	100	266 (139 - 961)	1.06 (0.41)	40
F3	100	680	1.76 (0.55)	103
F5	300	809	4.98 (2.29)	122
F10	300	847 (595 - 1168)	6.54 (2.68)	128

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban como nl de producto/ml de agua en discos de hojas de col.

<sup>b</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> se obtenían en la primera o segunda generación después de aplicar la selección.

<sup>c</sup> El valor del radio de la resistencia se obtenía dividiendo el valor de LC<sub>50</sub> de la cepa de Filipinas entre la LC<sub>50</sub> de la cepa control.

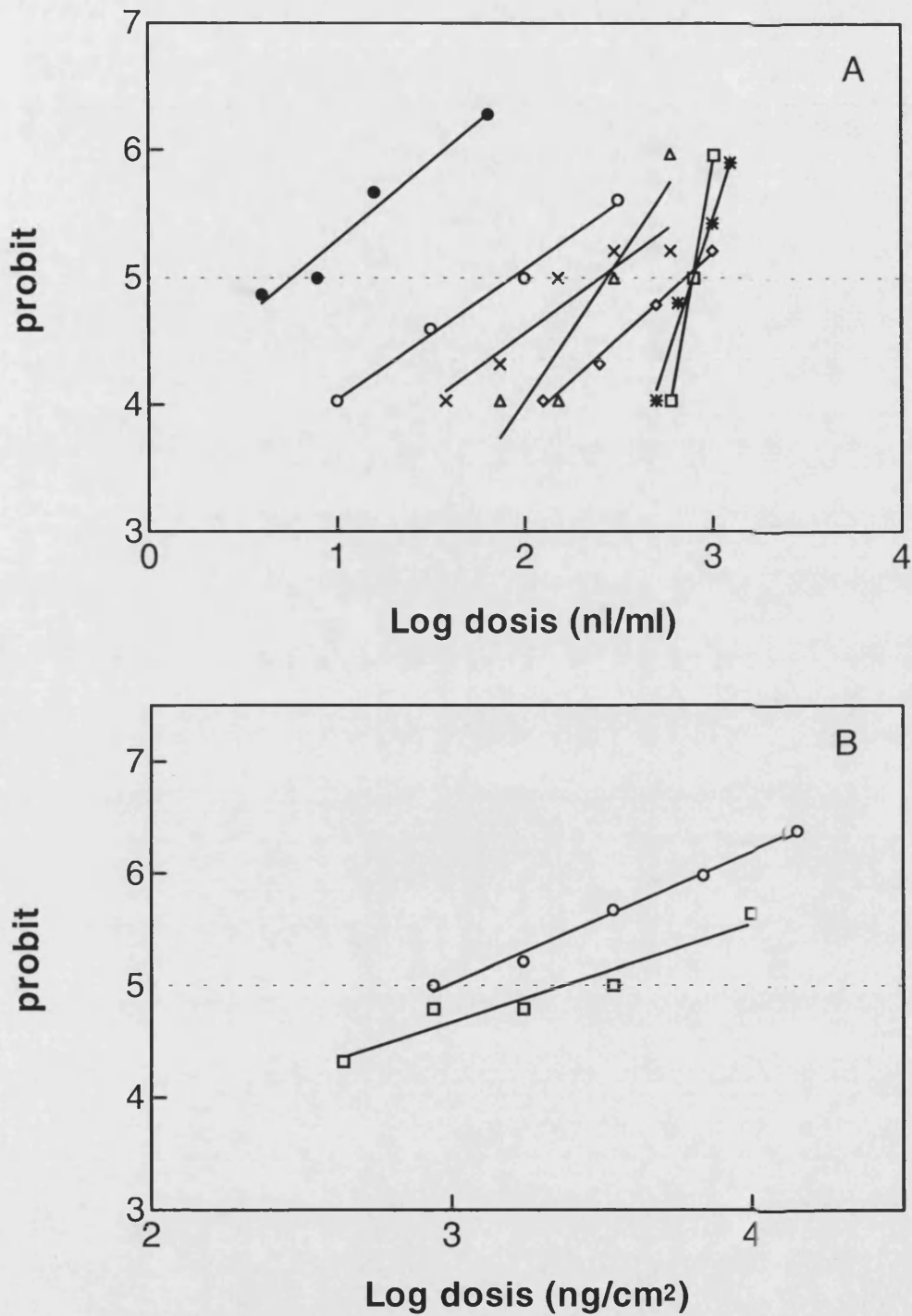
Al igual que ocurrió en la selección anterior se obtuvo una respuesta a la selección incrementándose tanto los valores de la LC50, frente a Cry1Ab (3 veces) y Myx-03604 (8.5 veces) respecto al inicio de la selección, como los valores de las pendientes. Con estos resultados observamos como la subpoblación BL2 presentó gran capacidad de respuesta frente a la selección con Cry1Ab pura y Myx-03604. En la tabla 15 y en las figuras 20 se puede observar los valores de resistencia cruzada para estos dos productos de *B.thuringiensis*.

**TABLA 15: Toxicidad de Cry1Ab y de Myx-03604 en larvas de tercer estadio de *P.xylostella* antes y después de la selección con Myx-03604. <sup>a</sup>**

ICP	Colonia de laboratorio	Colonia de Filipinas (BL2) <sup>b</sup>	
		Antes de la selección	Después de la selección
CryIA(b)	15 (5 - 30)	970 (123 - 1855) [65]	3200 [213]
Myx-03604	6.6	100 (36 - 274) [15]	850 (595 - 1168) [129]

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban en ng de proteína/cm<sup>2</sup> de dieta artificial el caso de las ICPs puras y como nl de producto/ml de agua en discos de hojas de col en el caso de Myx-03604.

<sup>b</sup> El valor del radio de la resistencia, expresado entre llaves, se obtenía dividiendo el valor de LC<sub>50</sub> de la cepa de Filipinas entre la LC<sub>50</sub> de la cepa control.



**Fig 19. Selección con Myx-03604**

**A:** Curvas de mortalidad a lo largo de la selección para el aumento de la resistencia frente a Myx-03604. Susceptible (●), F<sub>0</sub> (○), F<sub>1</sub> (x), F<sub>2</sub> (△), F<sub>3</sub> (◇), F<sub>5</sub> (∗), F<sub>10</sub> (□).

**B:** Evaluación de la generación de resistencia cruzada a Myx-03604 en la población BL2 seleccionada con Cry1Ab. BL2 antes de la selección (○), BL2 tras la selección (□).

## 2.6.- Evaluación de resistencia cruzada para las Cry1A's en las líneas seleccionadas con Cry1Ab y Myx-03604.

Una vez finalizadas las selecciones realizadas en BL2 con Cry1Ab y Myx-03604, se estudió la posible aparición de resistencias cruzada frente a toxinas de la familia de las Cry1A's. El resultado obtenido tras la selección con Cry1Ab fue una resistencia cruzada mínima tanto para Cry1Aa como para Cry1Ac (Tabla 16).

Sin embargo, las pruebas de toxicidad realizadas, tras la selección de la subpoblación BL2 con Myx-03604, pusieron de manifiesto la existencia de resistencia cruzada entre el híbrido y las toxinas Cry1A's. De manera que, la línea seleccionada ya no presentaba resistencia específica contra Cry1Ab sino generalizada frente las 3 toxinas Cry1A's (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac). Se analizaron cuerpos de inclusión, protoxinas y ICPs purificadas (Sin FPLC por que no es necesaria tanta calidad en la purificación). Las pruebas de toxicidad se realizaron sobre hojas de col intoxicadas con los distintos productos, (ver apartado 2.2 de Material y Métodos de este trabajo). Los resultados se muestran en las tablas ( 17, 18 y 19)

**TABLA 16: Toxicidad de las ICPs activadas en larvas de tercer estadio de *P.xylostella* antes y después de la selección con Cry1Ab. <sup>a</sup>**

ICP	Colonia de laboratorio	Colonia de Filipinas <sup>c</sup>	
		Antes de la selección	Después de la selección
Cry1Aa	239 (127 - 1045) <sup>b</sup>	310 (219 - 468) [-]	337 (197 - 606) [1.4]
Cry1Ac	44 (20 - 99)	40 (23 - 68) [-]	110 (59 - 225) [2.5]

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban en ng de proteína/cm<sup>2</sup> de dieta artificial.

<sup>b</sup> Límites fiduciales al 95%

<sup>c</sup> Resistencia relativa expresado entre llaves, se obtenía dividiendo el valor de LC<sub>50</sub> de la cepa de Filipinas entre la LC<sub>50</sub> de la cepa control.

**Tabla 17.- Toxicidad frente a los cuerpos de inclusión de la familia de las Cy1As en las poblaciones susceptible y resistente.<sup>a</sup>**

Cuerpos de inclusión	Susceptible	Resistente
	0.005mg/ml	0.005mg/ml
Cry1Aa	83.4	0
Cry1Ab	100	10
Cry1Ac	50	20

<sup>a</sup>La mortalidad viene expresada en porcentajes (%), tras dos días de exposición a los cuerpos de inclusión .

**Tabla 18.- Toxicidad frente a dos concentraciones de ICPs de la familia de las Cy1As en las poblaciones susceptible y resistente.<sup>a</sup>**

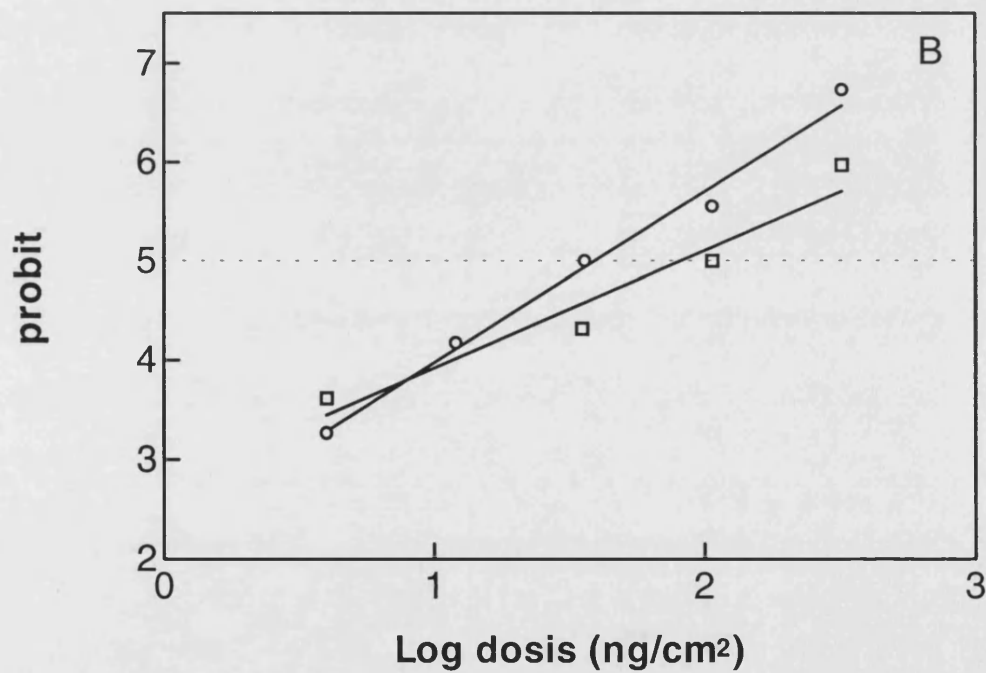
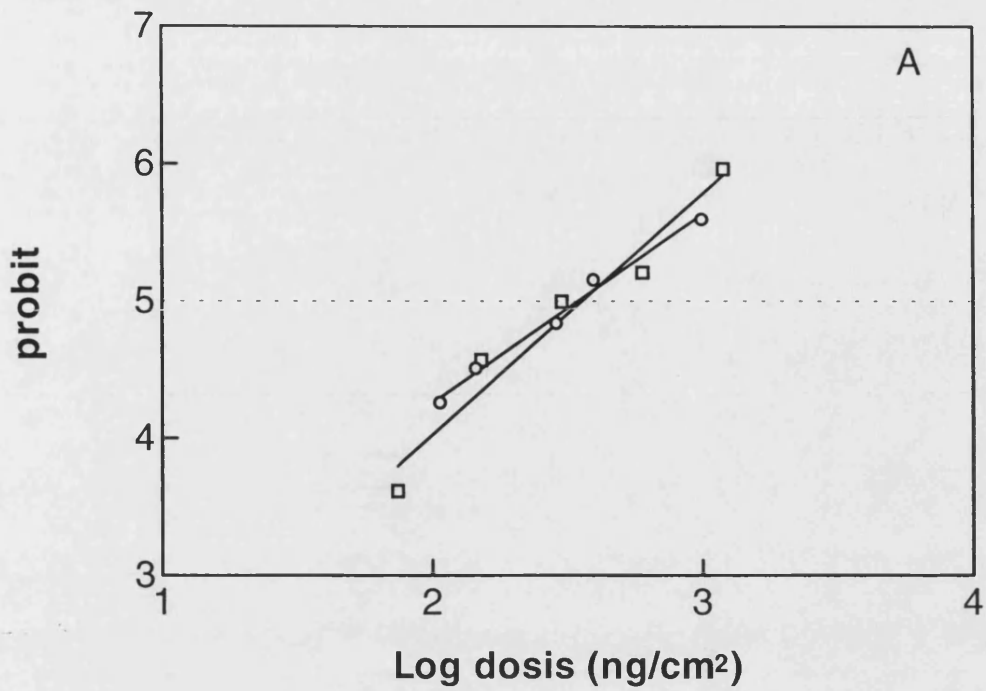
Protoxinas	Susceptible		Resistente	
	0.005mg/ml	0.002mg/ml	0.005mg/ml	0.002mg/ml
Cry1Aa	90	80	40	0
Cry1Ab	70	70	10	0
Cry1Ac	90	80	50	10

<sup>a</sup>La mortalidad viene expresada en porcentajes (%), tras dos días de exposición a las protoxinas.

**Tabla 19.- Toxicidad frente a dos concentraciones de ICPs activadas de la familia de las Cy1As en las poblaciones susceptible y resistente.<sup>a</sup>**

Toxinas	Susceptible		Resistente	
	0.005mg/ml	0.002mg/ml	0.005mg/ml	0.002mg/ml
Cry1Aa	90	30	20	0
Cry1Ab	90	40	10	0
Cry1Ac	100	60	40	30

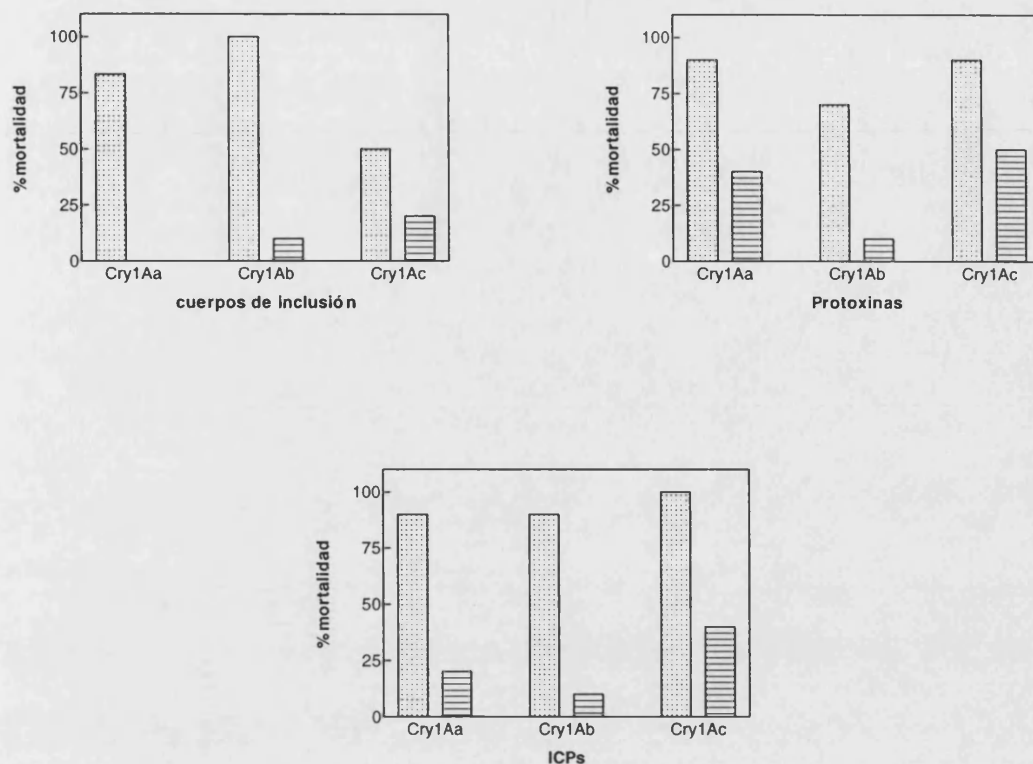
<sup>a</sup>La mortalidad viene expresada en porcentajes (%), tras dos días de exposición a las toxinas.



**Fig 20. Evaluación de la generación de resistencias cruzadas a frente a diferentes Cry1As por parte de la población seleccionada.**

**A:** Frente Cry1Aa: BL2 antes de la selección (○), BL2 tras la selección (□).

**B:** Frente a Cry1Ac: BL2 antes de la selección (○), BL2 tras la selección (□).



**Fig 21. Mortalidad (expresada en tanto por cien) observada en larvas susceptibles y resistentes (BL2) frente cuerpos de inclusión, protoxinas y toxinas activadas de las ICPs del grupo Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac).**

## 2.7.- Estima de la heredabilidad del carácter responsable de la resistencia.

La posibilidad de estimar la heredabilidad para un determinado carácter en una experiencia de selección nos va a permitir predecir la respuesta de la población frente a diferentes intensidades de selección. La estima de la resistencia obtenida mediante selección presentaba grandes dificultades ya que para su obtención era necesario disponer de un gran número de datos muchas veces difíciles de obtener. En 1992, Tabashnik propuso un método de obtención de la estima de la heredabilidad a partir de datos relativamente fáciles de obtener durante un proceso selección como son las  $LC_{50}$ , las pendiente, el porcentaje de mortalidad y las presiones de selección. Este método es el que se ha utilizado en este trabajo.



### 2.7.1.- Heredabilidad del carácter responsable de la resistencia a Cry1Ab.

El valor de la heredabilidad obtenida en la selección con Cry1Ab en BL1 fue de 0.023, es decir, un valor muy bajo lo que indica que el componente de genético en la resistencia era muy bajo (tabla 20). Sin embargo, en la experiencia de selección realizada también con Cry1Ab pero en BL2 se observa una heredabilidad mayor, es decir, un mayor componente genético en la herencia de la resistencia.

**Tabla 20: Estima de la heredabilidad en los procesos de selección a partir de la muestra BL1 y BL2.**

	Tramo	R	$\sigma_p$	i	S	$h^2$
BL1	F <sub>0</sub> - F <sub>10</sub>	0.018	0.855	0.931	0.796	0.023
BL2	F <sub>0</sub> - F <sub>3</sub>	0.388	1.112	0.913	1.015	0.382

R: respuesta a la selección.

$\sigma_p$ : desviación fenotípica estándar.

i: intensidad de la selección.

S: diferencial de la selección.

$h^2$ : heredabilidad.

### 2.7.2.- Heredabilidad del carácter responsable de la resistencia a Cry1Ba.

Como puede observarse en la tabla 21, el valor de la heredabilidad en la experiencia de selección con Cry1Ba en BL1 fue de 0.152. Si tenemos en cuenta los diferentes tramos de la selección se puede observar que la heredabilidad total se debe principalmente al primer tramo que corresponde a la realización de la mutagénesis. El tramo final F<sub>6</sub> - F<sub>8</sub> presenta una heredabilidad muy baja, lo que supone un componente genético muy pequeño.

### 2.7.3.- Heredabilidad del carácter responsable de la resistencia a Myx-03604.

En la experiencia de selección con Myx-03604 en BL2 (tabla 22), los valores de heredabilidad estimados son, tomando el experimento completo, semejantes a los encontrados en la selección con Cry1Ab realizada en BL2. Al igual que en la selección con Cry1Ba en BL1, en este experimento nos encontramos, en los primeros

tramos de la selección, valores de  $h^2$  muy altos, pero conforme transcurre el experimento, éstos van disminuyendo. Una explicación para esta disminución de  $h^2$  podría ser la pérdida de genes, y por tanto de variabilidad, que se produce a consecuencia de la selección.

**Tabla 21: Estima de la heredabilidad en diferentes tramos del proceso de selección con Cry1Ba a partir de la muestra BL1.**

Tramo	R	$\sigma_p$	i	S	$h^2$
F <sub>0</sub> - F <sub>6</sub>	0.090	0.606	0.863	0.523	0.172
F <sub>6</sub> - F <sub>8</sub>	0.015	0.922	1.320	1.217	0.012
F <sub>0</sub> - F <sub>8</sub>	0.068	0.447	1.002	0.448	0.152

R: respuesta a la selección.

$\sigma_p$ : desviación fenotípica estándar.

i: intensidad de la selección.

S: diferencial de la selección.

$h^2$ : heredabilidad.

**Tabla 22: Estima de la heredabilidad en diferentes tramos del proceso de selección a partir de la muestra BL2.**

Tramo	R	$\sigma_p$	i	S	$h^2$
F <sub>0</sub> - F <sub>1</sub>	0.444	0.560	0.830	0.465	0.955
F <sub>1</sub> - F <sub>2</sub>	0.000	0.569	0.863	0.491	0.000
F <sub>2</sub> - F <sub>3</sub>	0.407	0.709	0.863	0.612	0.665
F <sub>3</sub> - F <sub>5</sub>	0.038	0.297	1.039	0.309	0.123
F <sub>5</sub> - F <sub>10</sub>	0.003	0.174	1.202	0.209	0.014
F <sub>0</sub> - F <sub>10</sub>	0.093	0.261	0.966	0.252	0.369

R: respuesta a la selección.

$\sigma_p$ : desviación fenotípica estándar.

i: intensidad de la selección.

S: diferencial de la selección.

$h^2$ : heredabilidad.

### 3.- ANÁLISIS DE LA BASE GENÉTICA DE LA RESISTENCIA EN *Plutella xylostella* FRENTE A *Bacillus thuringiensis*.

Tras comprobar mediante pruebas de toxicidad que la subpoblación BL2 procedente de Filipinas presentaba una resistencia específica frente a Cry1Ab, que suponía una diferencia de 200 veces entre la LC<sub>50</sub> de BL2 y la población susceptible,

se procedió al análisis de las bases genéticas de dicha resistencia. Para la determinación del modo de herencia de este carácter, se realizaron cruces genéticos entre la subpoblación BL2 y la población susceptible control.

Los cruces realizados fueron Hembras Resistentes x Machos Sensibles y Hembras Sensibles x Machos Resistentes. En cada uno de los cruces se colocaron 10 hembras por cada 12 machos, asegurándonos de este modo la segura fecundación de las hembras.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que no pudieron ser explicados bajo ningún modelo genético de la herencia. El hecho de disponer de una población muy heterogénea genéticamente (BL2 estaba recién capturada de la naturaleza) e introducir muchos individuos en un sólo cruce nos hizo desechar estos resultados y repetir el experimento.

Posteriormente, y en colaboración con el Dr Tabashnik de la Universidad de Hawaii, se cruzaron nuevamente insectos susceptibles con insectos resistentes, tras su selección con el producto Myx-03604. Realizamos cruces de una única pareja entre adultos de la cepa susceptible de laboratorio (S) y la cepa resistente (BL2). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 23.

Las diferencias entre la progenie derivada de los dos tipos de cruces recíprocos (hembra S x macho R y hembra R x macho S) no fueron significativos, tal y como muestra el análisis de  $\chi^2$  (para Cry1Aa  $\chi^2 = 0.32$ , g.l. = 1; Cry1Ab  $\chi^2 = 0.002$ , g.l. = 1; Cry1Ac  $\chi^2 = 1.10$  g.l. = 1), indicando que la resistencia sigue una herencia de tipo autosómica.

De todos los cruces realizados con diferentes familias de insectos, nos quedamos únicamente con 16. A partir de ellos calculamos la dominancia aparente tal y como se describe en el apartado 5 de material y métodos de éste trabajo. En cada caso, primero estimamos la mortalidad causada por cada toxina ajustando la mortalidad total a la mortalidad del control utilizando la corrección de Abbott, (1925). Los resultados se muestran en la tabla 24. Tal y como muestra la tabla, podemos decir que BL2 presenta una resistencia dominante frente a Cry1Aa, recesiva frente a Cry1Ab y codominante frente a Cry1Ac.

**TABLA 23. Mortalidad encontrada en las poblaciones BL2 y S de *P.xylostella* y en los cruces recíprocos entre dichas poblaciones en respuesta a diferentes protoxinas de *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki*.**

Población	Porcentaje de mortalidad a los 5 días (n <sup>a</sup> )		
	Cry1Aa <sup>b</sup>	Cry1Ab <sup>b</sup>	Cry1Ac <sup>b</sup>
Susceptible	98.3 (60)	100 (92)	100 (60)
Resistente	4.9 (41)	40.7 (81)	22 (41)
Cruce BL2 x S	20.0 (60)	82.4 (91)	43.3 (60)
Cruce S x BL2	15.0 (60)	80.2 (91)	51.7 (60)

<sup>a</sup> Número de larvas testadas.

<sup>b</sup> La concentración de cada toxina fue de 0.01 mg de proteína/ml.

**Tabla 24: Mortalidad media encontrada en las larvas F<sub>1</sub> resultantes del cruce entre BL2 y S, junto con la dominancia aparente.**

Cruce	Cry1Aa		Cry1Ab		Cry1Ac	
	% mortalidad	h	% mortalidad	h	% mortalidad	h
BL2 x S	38.5	0.70	87.1	0.22	64.1	0.48

$h = (w_{12} - w_{22}) / (w_{11} - w_{22})$ . El valor del rango de h va de 0 (resistencia completamente recesiva) a 1 (resistencia completamente dominante).

#### 4.- MODELO DE RECEPTORES EN *Plutella xylostella*.

Mediante ensayos de unión de ICPs marcadas con <sup>125</sup>I se intentaba determinar el modelo de receptores para el insecto *P. xylostella*. Para ello, se marcaron radiactivamente dos ICPs del grupo Cry1A (Cry1Ab y Cry1Ac). Los experimentos de unión se realizaron tal y como se describe en el apartado 10 de material y métodos de este trabajo. La concentración de proteínas utilizadas en cada experimento se determinó mediante experimentos de saturación (fig 23) y fue 12 µg para Cry1Ab y 5 µg para Cry1Ac, obteniéndose un porcentaje máximo de unión de un 4% para la población susceptible tanto con <sup>125</sup>I-Cry1Ab como con <sup>125</sup>I-Cry1Ac. El porcentaje de unión en la población BL2 con la toxina <sup>125</sup>I-Cry1Ac fue de un 2.5%.

En colaboración con el doctor Tabahsnik de la Universidad de Hawaii y Tom Malvar de la Universidad de Pennsylvania, se realizó un estudio bioquímico de las poblaciones resistentes QA (Hawaii) y EG (Pennsylvania). Los estudios de unión

realizados con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac pusieron de manifiesto que, a diferencia de lo encontrado en nuestra población resistente BL2, las poblaciones resistentes QA y EG no presentaban unión frente a estas toxinas.

Una vez conocidas las condiciones de ensayo se realizaron las pruebas de competencia, homólogas y heterólogas, entre ICP marcada y no marcada para calcular los valores de  $R_t$  y  $K_d$  utilizando el programa LIGAND (Munson y Roadbar, 1980).

La tabla 25 muestra los parámetros cinéticos obtenidos a partir de experiencias de competencia.

Tanto los resultados obtenidos de las experiencias realizadas con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab como con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac, nos muestran que en poblaciones susceptibles de *P.xylostella*, las tres ICPs (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac) comparten un mismo lugar de unión a la membrana, pero presentando diferentes afinidades por él. Así, Cry1Ab es la toxina que mas afinidad presenta mientras que Cry1Aa muestra la menor afinidad. La población BL2 no presenta unión frente a  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab, pero si a Cry1Ac y Cry1Aa a diferencia de las poblaciones QA y EG que tampoco presentan unión frente a Cry1Ac. Como cabría esperar Cry1Ca, utilizada como control negativo, no presenta unión en ninguna de las dos poblaciones, Susceptible y BL2, a diferencia de Cry1Fa que si presenta competencia a  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac en BL2.

**Tabla 25.- Parámetros cinéticos obtenidos a partir de las experiencias de unión de  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab a vesículas de membrana de *P.xylostella*.**

ICP	Población susceptible		Población resistente (BL2)	
	$K_d + SD$	$R_t + SD$	$K_d + SD$	$R_t + SD$
Cry1Aa	27 + 5.7	0.3 + 0.1	No unión	-
Cry1Ab	0.4 + 0.2	0.31 + 0.1	No unión	-
Cry1Ac	5.5 + 2.0	1.2 + 0.4	No unión	-

$K_d$  es la constante de disociación del equilibrio y viene expresada en nM

$R_t$  es la concentración de lugares de unión a la membrana y viene expresada en pmol/mg de proteína de vesícula.

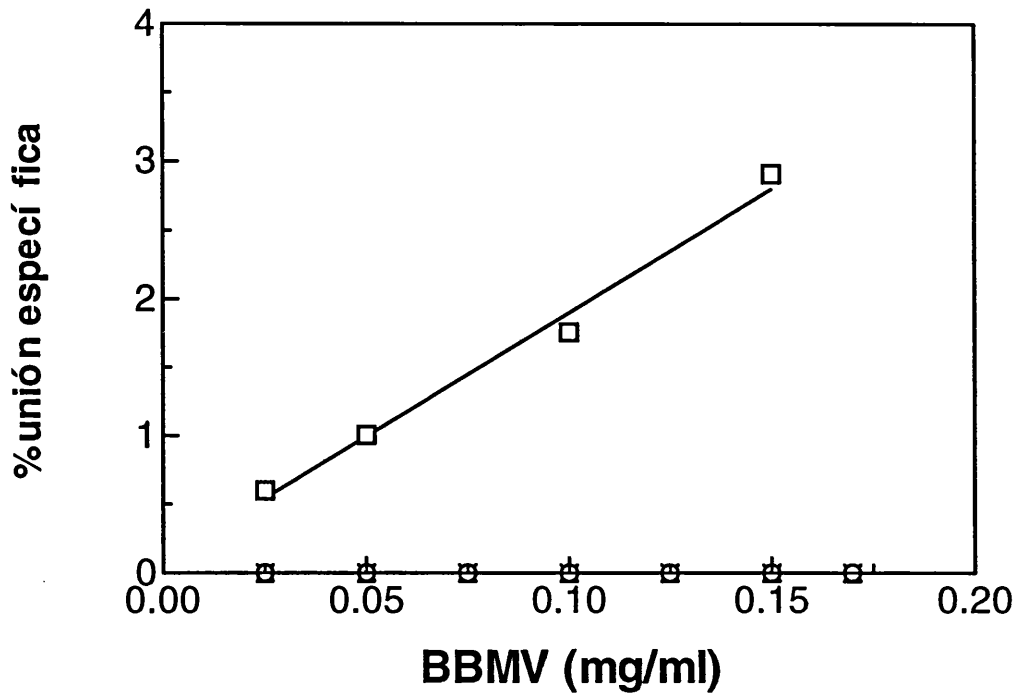
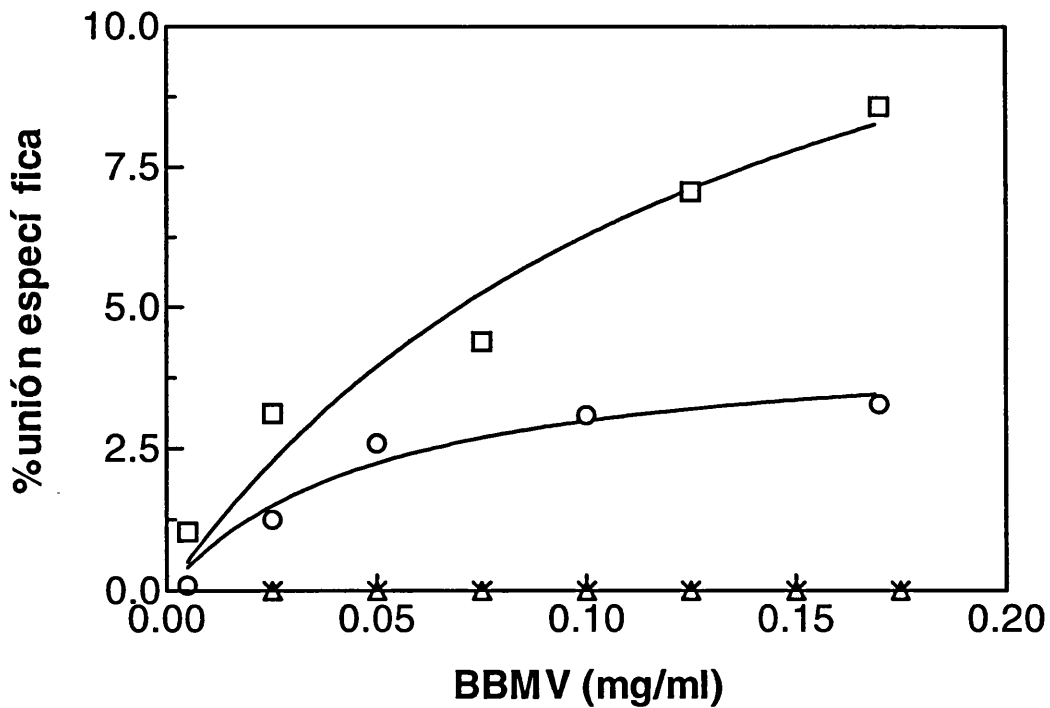
**$^{125}\text{I}$ -CRY1Ab** **$^{125}\text{I}$ -CRY1Ac**

Fig 22. Experiências de união a BBMV com ICPs marcadas com  $^{125}\text{I}$ . A:  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab com as populações Suscetível ( ) e Resistente BL2 (○) QA ( ) e EG ( ). B:  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac com as populações Suscetível (S) e Resistentes BL2 (○), QA ( ) e EG ( ).

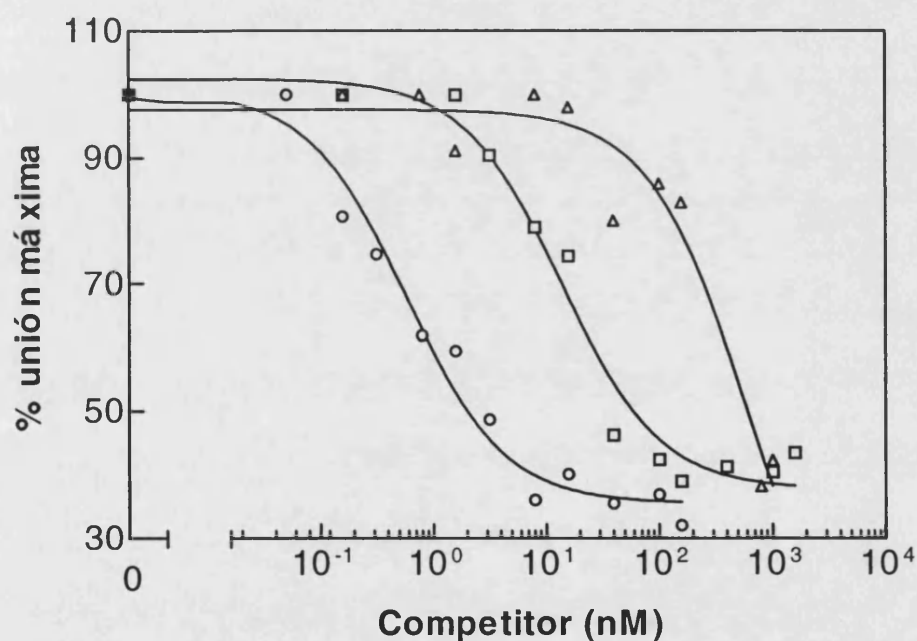
En la tabla 26 podemos ver los parámetros cinéticos obtenidos a partir de experiencias de competencia con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac en el insecto *P.xylostella*.

**Tabla 26.- Parámetros cinéticos obtenidos a partir de las experiencias de unión de Cry1Ac marcada con  $^{125}\text{I}$  a vesículas de membrana de *P.xylostella*.**

ICP	Población susceptible		Población resistente (BL2)	
	$K_d + \text{SD}$	$R_t + \text{SD}$	$K_d + \text{SD}$	$R_t + \text{SD}$
Cry1Aa	17.2 + 2.8	2.3 + 0.6	21.4 + 0.7	1.2 + 0.3
Cry1Ab	5.0 + 0.4	1.3 + 0.1	No unión	
Cry1Ac	17.0 + 0.2	1.0 + 0.1	19.2 + 0.3	1.0 + 0.1
Cry1Fa	No testada		14 + 0.1	1.6 + 0.1

$K_d$  es la constante de disociación del equilibrio y viene expresada en nM.

$R_t$  es la concentración de lugares de unión a la membrana y viene expresada en pmol/mg de proteína de vesícula.



**Fig 23. Experiencias de competencia con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab en la población susceptible.**

Cry1Aa (  $\Delta$  ), Cry1Ab (  $\circ$  ) y Cry1Ac (  $\square$  ).

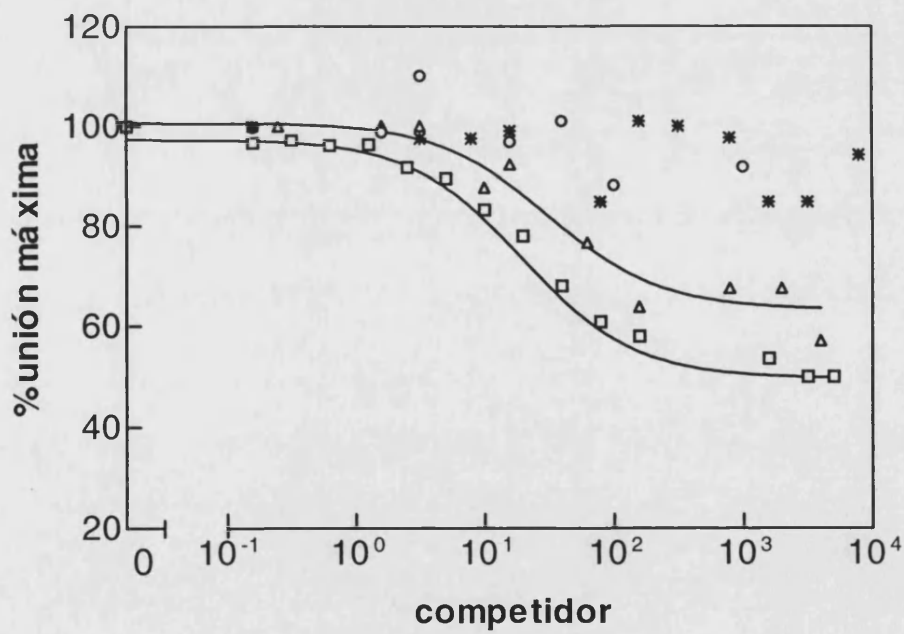
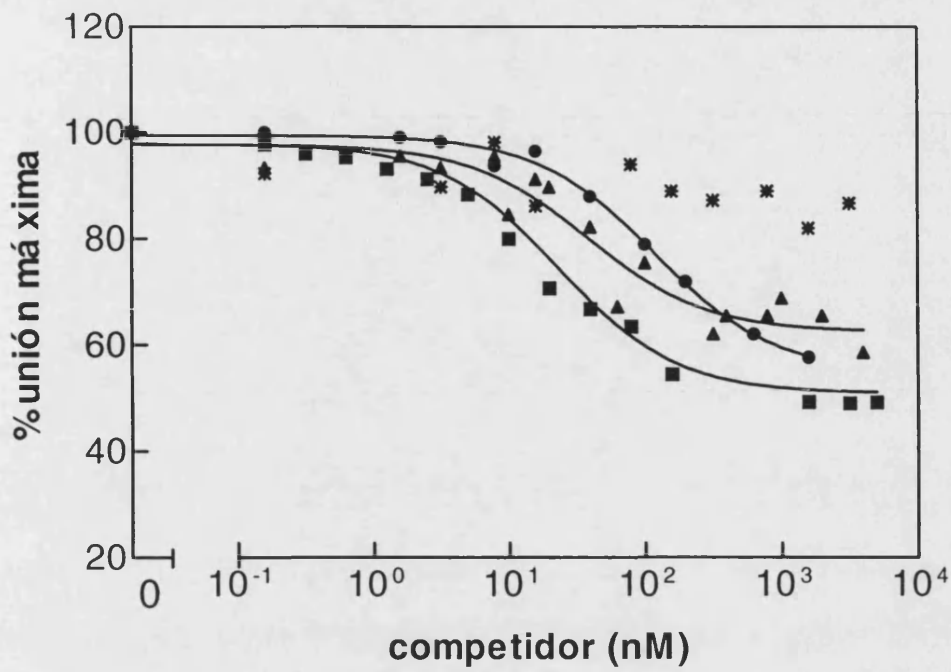
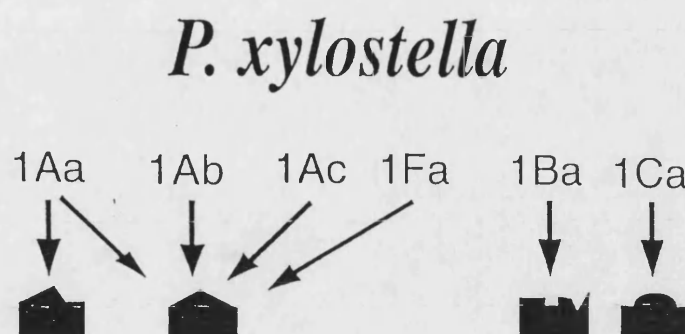


Fig 24. Experiencias de competencia con <sup>125</sup>I-Cry1A. A: población susceptible. B: población resistente (BL2)Cry1Aa (□), Cry1Ab (○) y Cry1Ac (△).





**Fig 25. Modelo de receptores propuesto para *P.xylostella*.**

#### **5.- DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE TOXINAS QUIMÉRICAS FRENTE A *Plutella xylostella*.**

Las toxinas quiméricas proporcionadas por la empresa Warenningen (Holanda), F26 y G27, fueron el resultado de la recombinación entre los dominios II y III de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ea. De modo que, mientras F26 era un híbrido de Cry1Ca con el dominio III de Cry1Ea; G27 era su opuesto, es decir, era presentaba sustituido el dominio III de Cry1Ca. En las lavas susceptibles de *P.xylostella* se comprobó que, mientras la toxina Cry1Ca resultaba ser tóxica para, Cry1Ea no lo era o sólo a altas concentraciones. Tal y como muestra la tabla 30, la toxina quimérica F26, presentaba en larvas susceptibles unos valores de toxicidad y de pendiente comparables a la que encontrábamos para la Cry1Ca, mientras que la toxina quimérica G27 era comparable a Cry1Ea.

A la vista de los resultados podemos decir que la toxicidad de Cry1Ca para el insecto *P. xylostella* viene determinada por el dominio II sin que afecten los dominios I y III.

**TABLA 27: Toxicidad de las ICPs activadas Cry1Ca y Cry1Ea y de sus híbridos en larvas susceptibles de tercer estadio de *Plutella xylostella*.<sup>a</sup>**

ICP	Colonia de laboratorio	
	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> )	Pendiente (S.E.)
Cry1Ca	117 (68 - 210)	1.78 (0.21)
Cry1Ea	>1600	---
F26	75 (36 - 160) <sup>b</sup>	2.27 (0.49)
G27	>1600	---

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban en ng de proteína/cm<sup>2</sup> de dieta artificial en el caso de las ICPs

<sup>b</sup> Límites fiduciales al 95%.

**TABLA 28: Toxicidad de los híbridos recombinantes Cry1Ab/Cry1Ac/Cry1Ca en larvas de tercer estadio de *Plutella xylostella*.<sup>a</sup>**

ICP	Colonia de laboratorio		Colonia de Filipinas (BL2)	
	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> )	Pendiente (S.E.)	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> )	Pendiente (S.E.)
Cry1Ab	15 (5 - 30)	1.29 (0.15)	3550 (1100 - 68000)	0.43 (0.14)
Cry1Ac	44 (29 - 99)	1.80 (0.38)	40 (23 - 68)	1.66 (0.25)
Cry1Ca	117 (68 - 210)	1.78 (0.21)	80 (56 - 130)	1.76 (0.31)
Cry1Ab*	10	1.00 (0.29)	20	0.85 (0.48)
H04	4.0	1.23 (0.32)	560	0.85 (0.46)
SAM2	12	0.77 (0.27)	No testada	-

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> los límites fiduciales al 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban en ng de proteína/cm<sup>2</sup> de dieta artificial en el caso de las ICPs.

<sup>b</sup> Límites fiduciales al 95%.

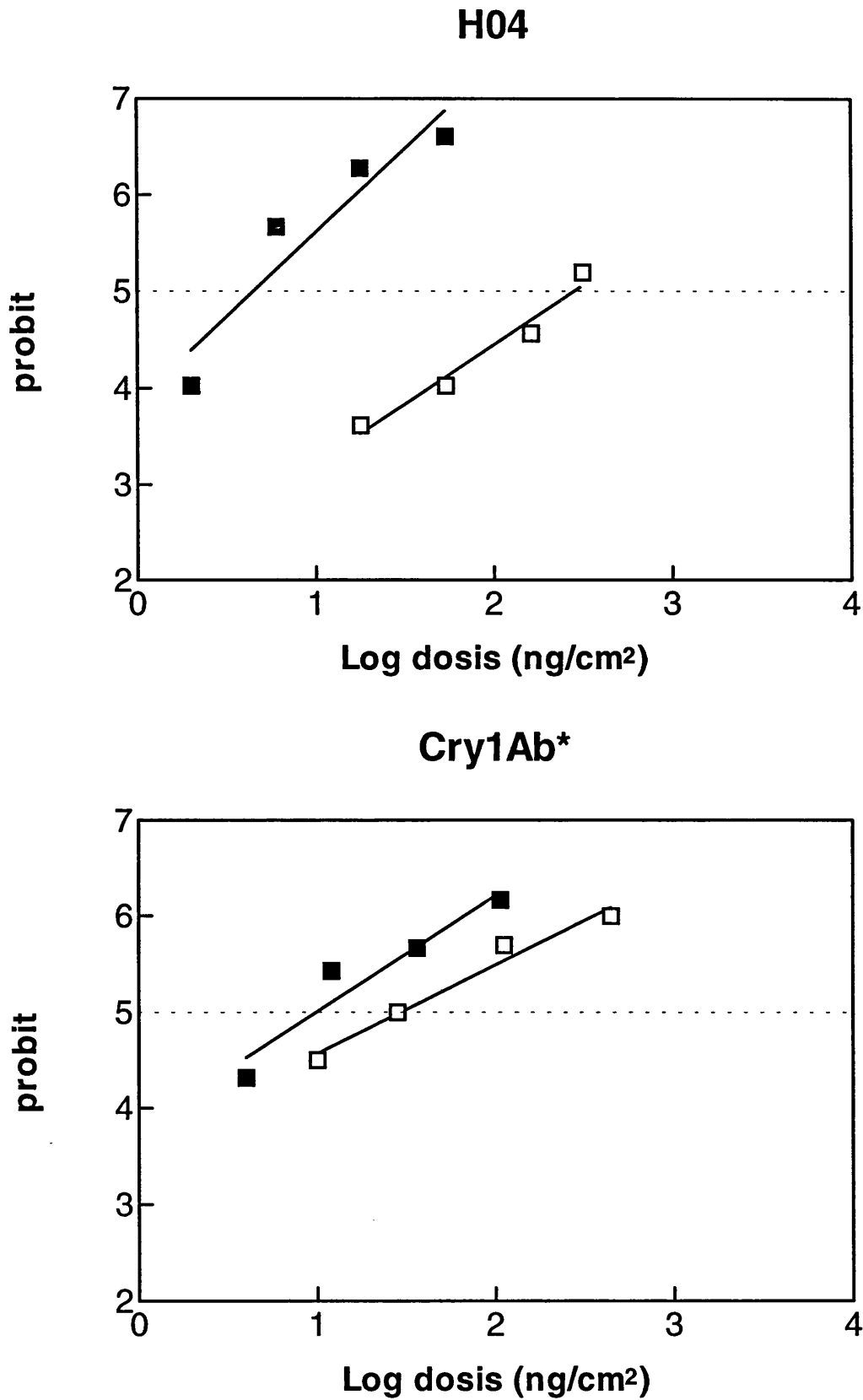


Fig 26. Curvas de toxicidad obtenidas en los ensayos de toxicidad realizados en las poblaciones S ( ) y BL2 ( ) de *P. xylostella* frente a las ICPs H04 y Cry1Ab\*.

Como ya se indicaba en el apartado 1 de resultados de este trabajo, Cry1Ab y Cry1Ac resultaba tóxicas para insectos susceptibles de *P.xylostella*. Análisis posteriores de toxicidad indicaron que la toxina recombinante Cry1Ab\*, un híbrido de Cry1Ac con el dominio III de Cry1Ab, presentaba unos valores de toxicidad y pendiente similares a la encontrada para Cry1Ab. Las pruebas de toxicidad realizadas con éste híbrido en larvas específicamente resistentes a Cry1Ab mostraron una mortalidad comparable a la obtenida en la población susceptible.

La toxina quimérica H04, híbrido de la toxina Cry1Ab con el dominio III sustituido por el de la toxina Cry1Ca, es ligeramente mas tóxica frente a larvas susceptibles, que la toxina natural Cry1Ab teniendo en cuenta los límites fiduciales, sin embargo es 30 veces mas tóxica que Cry1Ca, a pesar de poseer el dominio III de ésta. La resistencia encontrada en la población BL2 (140 veces) frente a H04 nos confirma la implicación del dominio II en la determinación de la toxicidad.

La toxicidad encontrada, en larvas susceptibles, frente a SAM2, un híbrido de Cry1Ab con el dominio I de Cry1Ac es del mismo orden a la encontrada con Cry1Ab. Los valores de la pendiente encontrados para las diferentes toxinas probadas, tanto naturales como quiméricas fueron aproximadamente del mismo orden, presentando SAM2 el valor mas bajo y Cry1Ac y Cry1Ca el valor mas alto. EL hecho de disponer de la toxina quimérica SAM2 cuando la población BL2 ya había sido seleccionada con Myx-03604, lo que suponía una resistencia generalizada para todas las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, hizo innecesario su análisis toxicológico.

## DISCUSIÓN

## 1.- TOXICIDAD DE *Bacillus Thuringiensis* FRENTE A *Plutella xylostella*.

Los estudios toxicológicos realizados sobre una población susceptible de *P. xylostella* mantenida en el laboratorio y utilizada como control, nos ha permitido completar el estudio sobre la efectividad de *B. thuringiensis* como insecticida biológico. Se ha realizado pruebas de toxicidad con 7 ICPs diferentes del grupo Cry1. De todas ellas, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1B han sido las mas efectivas mientras que Cry1E no ha resultado tóxica o sólo a concentraciones muy altas. El resto de ICPs (Cry1Aa, Cry1C y Cry1F) presentan una efectividad similar.

La tabla 29 nos muestra la comparación de los resultados obtenidos en *P. xylostella* frente a los obtenidos en diferentes insectos plaga descritos en la bibliografía.

**TABLA 29: LC50 de las ICPs de *B. thuringiensis* en poblaciones susceptibles de distintas especies de lepidópteros. <sup>a</sup>**

ICPs	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1B	Cry1C	Cry1D	Cry1E	Ref. <sup>b</sup>
<i>H.virescens</i>	157	7	2	-	>2.700	-	>2.700	(1), (2)
<i>L.botrana</i>	130	7	77	174	-	24	255	(3)
<i>L.dispar</i>	-	1	425	-	-	-	-	(4)
<i>M. sexta</i>	20	20	9	-	111	-	73	(1), (2)
<i>P.xylostella</i>	293	15	44	35	80	-	>1600	(5), (6)
<i>S. littoralis</i>	>1350	-	-	-	93	-	88	(2)
<i>T.ni</i>	570	480	320	5640	-	2530	-	(7)

<sup>a</sup> Los valores de LC50 vienen expresados en ng de proteína/cm<sup>2</sup>

<sup>b</sup> (1) Van Rie *et al.*, 1989; (2) Van Rie *et al.*, 1990; (3) Tesis Doctoral de Ana Carmen Piedrafita; (4) Wolfersberger *et al.*, 1990; (5) Ballester *et al.*, 1994; (6) datos presentados en este trabajo; (7) Estada y Ferré, 1994.

Los valores de LC<sub>50</sub> obtenidos en *P. xylostella* son similares a los encontrados en otras especies frente a las ICPs analizadas. Sólo en el caso de *Tricoplusia ni* se observan valores de LC<sub>50</sub> significativamente superiores al resto de los especies.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de éstas proteínas (Thompson *et al.*, 1995), pone de manifiesto que el gen que codifica para Cry1B es el mas alejado

evolutivamente de los que codifican para las ICPs de tipo Cry1A, Cry1C, CryE y Cry1F. Sin embargo, estas relaciones evolutivas no se han reflejado en su toxicidad frente *P. xylostella*, ya que mientras Cry1E resulta no activa, Cry1B presenta una actividad semejante a Cry1Ab.

Este tipo de estudios toxicológicos suponen una herramienta importante a la hora de decidir que ingredientes activos deben tener en su composición los productos comerciales utilizados en el control de la plaga. En nuestro caso, y dado que las ICPs de grupo Cry1A se muestran activas contra lepidóteros como *P. xylostella*, los productos comerciales ensayados han sido Dipel y Thuricide ya que ambas formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* contienen como ingrediente activo mayoritario las Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac) y las Cry2. Las ICPs del tipo Cry2 no han sido ensayadas debido a que Cry2Aa presenta una toxicidad relativamente baja (Tabashnik *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1996) y Cry2Ab no presenta toxicidad contra *P. xylostella* (Tabashnik *et al.*, 1996).

Contrariamente a lo encontrado hasta el momento, la mortalidad encontrada en los ensayos de toxicidad realizados tanto con Dipel como con Thuricide es inferior a la esperada teniendo en cuenta la toxicidad individual de cada una de la ICPs que componen el formulado. Sin embargo este tipo de comparaciones resultan arriesgadas teniendo en cuenta que no conocemos exactamente la composición cuantitativa de ICPs de los dos productos comerciales probados. En el caso de Dipel sabemos que la composición es de 28% para Cry1Aa, de 53% para Cry1Ab y de 19% para Cry1Ac, sin embargo no tenemos información acerca de Thuricide. La bibliografía muestra casos en los que la acción conjunta de las proteínas insecticidas actúan de forma sinérgica. El caso mas claro es la diferencia en la actividad de las ICPs de tipo Cry4 y las proteínas Cyt, producidas por *B. thuringiensis* subsp *israeliensis*, cuando lo hacen de forma conjunta o individualmente (Wu y Chang, 1985; Federici *et al.*, 1990; Crickmore *et al.*, 1995). Se ha encontrado que la cepa HD-1 interactua de forma sinérgica para producir una mortalidad en *L. dispar*, pudiendo ser incluso 10 veces mayor de lo esperado (Dubois y Dean, 1995; Van Frankenhuyzen *et al.*, 1991). El hecho de que las esporas producidas por *B. thuringiensis* contengan proteasa puede contribuir a la aparición de sinergismos debido a la activación de las protoxinas a proteínas activadas facilitando así su función insecticida. De ahí que la acción del precipitado obtenido a partir de cultivos esporulados de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

frente a *S. littura*, se ve favorecida cuando se mezcla con el sobrenadante (Asano *et al.*, 1995).

Al no disponer en la bibliografía de casos de antagonismo entre toxinas que expliquen la menor toxicidad encontrada en los productos comerciales debemos pensar en diferentes factores que puedan afectar a la toxicidad como la solubilización de las  $\delta$ -endotoxinas en el intestino dependiendo de la composición en protoxinas de las inclusiones de *B. thuringiensis* (Aronson *et al.* 1995), los componentes de las esporas y los compuestos utilizados como excipientes en los preparados comerciales.

El producto Myx-03604, Cry1Ab con 9 aminoácidos sustituidos de Cry1Ac, se muestra en la población S más eficaz que el resto de las ICPs puras probadas. Myx-03604 se ha analizado mediante los dos tipos de ensayos de toxicidad (hojas y comida artificial) confirmándonos que podemos comparar los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

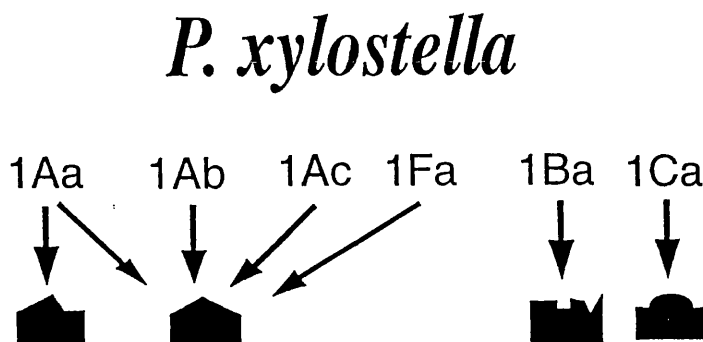
Tras 30 años de utilización de *B. thuringiensis* como insecticida biológico para el control de *P. xylostella*, han ido apareciendo los problemas. Sin duda alguna, el más importante ha sido, y es, el desarrollo de resistencias. De ahí que, dado el enorme esfuerzo tanto económico como humano que supone el descubrimiento de nuevos agentes insecticidas, sea fundamental el estudio y el uso racional de estos productos.

## **2.- SITIOS DE UNIÓN PARA LAS PROTEÍNAS DEL GRUPO CRY1A DE *Bacillus thuringiensis* EN EL INTESTINO DE *Plutella xylostella*.**

Mediante diferentes clases de experimentos de unión a membrana y utilizando diferentes toxinas marcadas con  $^{125}\text{I}$ , hemos podido determinar las características del receptor tales como su concentración ( $R_t$ ) y su afinidad ( $K_d$ ). Los experimentos de competencia homóloga y heteróloga realizados en larvas susceptibles, tanto con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab como con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac han puesto de manifiesto que Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac comparten un lugar de unión a la membrana intestinal de *P. xylostella*, confirmándose así un resultado obtenido con anterioridad (Ballester *et al.*, 1994). Ferré *et al.*, (1991) demostraron que las ICPs Cry1Ab, Cry1B y Cry1C no competían entre sí por la unión a la membrana, de modo que cada tipo de toxina presentaba tres lugares de unión diferente. Granero *et al.*, (1996) comprobaron, mediante



experimentos de competencias heterólogas, que Cry1Fa competía por el lugar de unión a membrana de la Cry1Ab. Así pues el modelo de receptores propuesto para *P.xylostella* a partir de datos propios (Ballester *et al.*, 1996) junto con datos de Ferré *et al.*, (1991) y Denno *et al.*, (1993b) sería el siguiente:



**Fig 27:Esquema del modelo propuesto para *P.xylostella***

Las tres ICPs Cry1As, compartirían un mismo receptor junto con Cry1F mientras que Cry1B y Cry1C presentarían su propio receptor. Por otro lado, no se encontrarían receptores frente a Cry1D y Cry1E.

Las proteínas Cry1, y en especial la Cry1As, componen un grupo de ICPs que muestra un porcentaje de homología mayor al 80% en la parte activa de la toxina (Tabla 30). Estas altas similitudes se deben a un origen evolutivo común y además hacen pensar que todas las toxinas de este grupo presentarían un modo de acción similar e incluso que pudieran utilizar la misma maquinaria biológica. En los modelos propuestos para otras especies de insectos como *M. sexta*, *H. virescens* y *P. operculella* se observa que también presentan un receptor al cual se unen los tres ICPs del subgrupo Cry1A (Escriche *et al.*, 1995c). *Tricoplusia ni* presenta un receptor común para Cry1Ab y Cry1Ac que no comparte con Cry1Aa. Otras especies de insectos como *Lymantria dispar*, en el que no se ha analizado Cry1Aa, se ha encontrado un receptor al cual se unen específicamente Cry1Ab y Cry1Ac. En general, y a la vista de los resultados obtenidos a partir de familias de lepidóteros

taxonomicamente alejadas, podemos decir que en este orden de insectos es una característica común que las tres ICPs del subgrupo Cry1A se unan a un receptor común. La mayoría de las especies presentan un receptor común al cual unen las tres ICPs y en algunas especies que no han sido estudiadas mas exhaustivamente, se ha encontrado la unión de una o dos ICPs.

**Tabla 30.- Porcentaje de homología entre los aminoácidos de diferentes ICP del grupo Cry1 (Chambers *et al.*, 1991).**

	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1B	Cry1C	Cry1F
Cry1Aa	90	82	55	67	71
Cry1Ab		86	56	66	70
Cry1Ac			55	67	69
Cry1B				58	58
Cry1C					70

La tabla 31 muestra los datos de Rt y Kd obtenidos por diferentes autores tras el marcaje de  $^{125}\text{I}$ -Cry1A.

**Tabla 31.- Porcentaje de receptores (Rt) y constantes de disociación (Kd) de Cry1Ab procedentes de larvas susceptibles de *P.xylostella*.**

	Kd (nM)	Rt (pmol/mg prot)
Ferré <i>et al.</i> , 1991	4.2 + 2.5	1.6 + 1.2
Ballester <i>et al.</i> , 1994	1.4 + 0.7	0.8 + 0.27
Granero <i>et al.</i> , 1996	1.2 + 0.3	0.69 + 0.12
Ballester <i>et al.</i> , 1996	0.4 + 0.2	0.31 + 0.1

$K_d$  es la constante de disociación del equilibrio y viene expresada en nM.

$R_t$  es la concentración de lugares de unión a la membrana y viene expresada en pmol/mg de proteína de vesícula.

Como comentabamos en la introducción de este trabajo, a pesar de que la unión de las ICP a los receptores juegan un importante papel en su toxicidad frente al

insecto, no existe una correlación general entre la toxicidad *in vivo* y los valores de Rt y Kd de los receptorés tal y como demostraron Garczynski et al., (1991) y Van Rie et al., (1990) con larvas susceptibles de *H. virescens*. Lo que nos lleva a afirmar que la unión de las toxinas al intestino de los insectos es responsable de la especificidad pero no de la toxicidad.

### **3.- RESISTENCIA EN *Plutella xylostella* FRENTE A ICPs DE *Bacillus thuringiensis*.**

Los insectos han sido capaces de generar resistencias frente a todos y cada uno de los productos utilizados para su control y *B. thuringiensis* no ha sido una excepción. Se han descrito resistencias a ICPs en numerosas especies de insectos, bien en poblaciones naturales o tras selección en el laboratorio (Ferré et al., 1995). La primera experiencia de selección se realizó con una población natural de *P. interpunctella* (McGaughey 1985a), tras la cual se obtuvo un aumento en el valor de la LC50 para Dipel de 100 veces. Otro insecto que ha respondido a la selección ha sido *H.virescens*. ya que disminuyó sus susceptibilidad en 10.000 veces frente a Cry1Ac tras su selección con esta ICP (Lee et al., 1995). También se ha conseguido seleccionar para la resistencia a diferentes ICPs en poblaciones de *T. ni*, *S. exigua*, *L. decemlineata* y *C. scripta* (Estada y Ferré, 1994; Moar et al, 1995; Whalon et al, 1993). Sin embargo, *P. xylostella* ha sido el único insecto capaz de crear resistencia frente a *B.thuringiensis* en la naturaleza (Filipinas, Japón, Malasia, Hawaii, Pensilvania, Florida) y no es de extrañar que aparezcan mas casos.

En este trabajo hemos comparado dos muestras, BL1 (analizada por Ferré et al, 1991) y BL2 (analizada por Ballester et al, 1994), extraídas de una población natural resistente de *P. xylostella* procedente de Filipinas. Los dos muestreos se realizaron en el mismo lugar pero con una diferencia de tiempo de 4 años. Mediante estudios toxicológicos (realizados al poco tiempo de su captura) hemos demostrado que, durante este periodo de tiempo, la población de Filipinas ha mantenido estables sus niveles de resistencia (específica) frente a Cry1Ab (200 veces). Respecto al resto de ICPs analizadas y específicas para lepidópteros, encontramos resultados similares salvo en el caso de Cry1Ba en el que la efectividad de esta ICP resulta ser menor (15 veces) en la muestra BL2. Sin embargo, y observando el resultado obtenido en la

población control, podemos afirmar que la diferencia de toxicidad puede explicarse por una degradación parcial de dicha ICP.

**TABLA 32: Comparación de los valores de LC<sub>50</sub> frente a ICPs de *B.thuringiensis* entre las muestras BL1 Y BL2 tras su captura de la naturaleza.<sup>a</sup>**

ICP	Muestra BL1		Muestra BL2	
	LC <sub>50</sub> (FL <sub>95</sub> )	Pendiente	LC <sub>50</sub> (FL <sub>99</sub> )	Pendiente
Cry1Aa	n.t.		310	1.94
Cry1Ab	>1350	-	3550(1100-68000) <sup>b</sup>	0.43
Cry1Ac	n.t.		40	1.66
Cry1Ba	2.3 (0.7-5.3)	2.6	36 (11-68)	1.74
Cry1Ca	46.5 (23.9-84.4)	1.2	80 (56-130)	1.78
Cry1D	>1350	-	n.t.	
Cry1Ea	>1350	-	>1600	-
Cry1Fa	n.t.		212	1.95

<sup>a</sup> Los valores de LC<sub>50</sub> y los límites fiduciales al 95% (FL<sub>95</sub>) y 99% (FL<sub>99</sub>) se expresaban en ng de proteína /cm<sup>2</sup> de dieta artificial.

<sup>b</sup> Límites fiduciales al 95%

<sup>c</sup> n.t.= no testada.

La comparación de estudios de resistencia y resistencia cruzada en otras cepas de *P. xylorella* revelan algunas similitudes y diferencias. Todas las cepas resistentes de *P.xylorella* obtenidas de la naturaleza como la de Florida (Tang *et al.*, 1996), Hawaii (Tabashnik *et al.*, 1996) o la nuestra de Filipinas, muestran un relativo estrecho espectro de resistencias cruzadas. En particular, estudios independientes de cada cepa han mostrado que resistencias mayores de 100 veces a una o mas toxinas Cry1A confieren resistencias cruzadas para Cry1B o Cry1C menores a 10 veces (Ferré *et al.*, 1991; Tabashnik *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1996). La cepa resistente de Florida y Hawaii muestran resistencias cruzadas menores a 10 veces frente a Cry1D. Esta proteína resulta muy activa tanto contra cepas resistentes de Florida y Hawaii como contra las cepas susceptibles de Nueva York y Hawaii. Sin embargo, se ha detectado una falta de toxicidad frente a Cry1D en nuestra cepas susceptible procedente de

Holanda y en la muestra BL1 de la población resistente de Filipinas. Estos resultados podrían indicar que la preparación específica de la proteína o el bioensayo llevado a cabo, puede afectar al resultado encontrado frente a Cry1D. La toxicidad encontrada tanto en nuestras cepas BL1, BL2 y susceptible como en las poblaciones resistentes de Hawaii y Florida, frente a Cry1E, fue baja o nula (Ferré *et al.*, 1991; Ballester *et al.*, 1994; Tabashnik *et al.*, 1994c; Tang *et al.*, 1996). La población resistente de Hawaii (Tabashnik *et al.*, 1994) presentó altos niveles de resistencia cruzada frente a la ICP Cry1Fa, mientras que nuestra población resistente procedente de Filipinas (BL2) resultó tóxica.

Ninguna de las toxinas de *B. thuringiensis* testadas contra nuestra población resistente o cualquier otra de las cepas resistentes de *P. xylostella* (Bravo *et al.*, 1992; Ferré *et al.*, 1991; Ballester *et al.*, 1994; Lambert *et al.*, 1996; Tabashnik *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1996), fue significativamente más tóxica para la cepa resistente que para la cepa sensible. Por ello podemos concluir que la resistencia cruzada negativa entre toxinas de *B. thuringiensis* es improbable. Así pues, la utilización de toxinas podría ser útil, particularmente para combatir resistencias de margen relativamente estrecho como el observado en *P. xylostella*, de ahí la gran importancia de la determinación toxicológica de las ICP de *B. thuringiensis* frente a *P. xylostella* para su control. Además, mediante adecuadas combinaciones de proteínas podremos obtener resultados adecuados por su efectividad y por su prevención al desarrollo de resistencias.

El hecho de que BL1 mostrara alta resistencia a Cry1Ab pero sin embargo fuera susceptible frente a Dipel, nos llevó a realizar en la muestra BL2 el análisis individual de cada una de las ICP que lo componían. El resultado obtenido ha sido que BL2 es resistente, específicamente, a Cry1Ab pero no al resto de las Cry1As. Esto explicaría la toxicidad encontrada frente a Dipel. El mismo resultado se ha obtenido con el compuesto Thuricide. Por otro lado, los bioensayos realizados en BL2 con Myx-03604 han puesto de manifiesto la existencia de resistencia frente a este producto.

La posibilidad de disponer de dos muestras BL1 y BL2 cuya diferencia radicaba en el tiempo que había pasado BL1 en el laboratorio, nos ha permitido estudiar las diferentes respuestas en las distintas selecciones artificiales realizadas con cada una de ellas. Tanto la selección realizada con Cry1Ab como la realizada con

Cry1Ba han puesto de manifiesto que BL1 presenta un genoma muy homogeneizado y poca variabilidad genética debido a su estancia en el laboratorio. De tal manera que únicamente se ha conseguido aumentar la resistencia en la selección con Cry1Ba como consecuencia del aumento de la variabilidad producida mediante métodos indirectos como la mutagénesis tal y como muestran los valores de las LC<sub>50</sub> y de las pendientes.

Las selecciones se han realizado aplicando una dosis en torno a la LC<sub>50</sub> de la población con la intención de favorecer la selección de tipo monogénico frente a las que se obtienen con presiones bajas, de tipo poligénico. El mantenimiento o aumento de la resistencia obtenida mediante las selecciones en el laboratorio, tanto con Cry1Ab como con Cry1Ba, responden más a la acción de varios genes menores (poligenes) que a un gen único gen, lo que contribuye a que ésta se pierda más rápidamente.

La inestabilidad de la resistencia observada en BL1, en ausencia de presión selectiva, puede ser explicada por la menor eficacia biológica de los individuos resistentes al compararlos con los susceptibles (Groeters *et al.*, 1993; Groeters *et al.*, 1994) y por la no fijación de los genes de la resistencia en la población. Los fenómenos de pérdida de resistencia se han descrito tanto en insecticidas químicos como en los biológicos. En *B. thurigiensis* se ha encontrado inestabilidad de la resistencia en poblaciones de *P. xylostella*, *P. interpunctella* y *H. virescens* (Tabashnik *et al.*, 1994; Hama *et al.*, 1992; McGaughey y Beeman, 1988; Sims y Stone, 1991). Un factor que podría contribuir a la menor eficacia biológica sería la existencia de desequilibrios de ligamiento, esto significa que genes que no están implicados en la resistencia a las ICPs, pero que afectan a la eficacia biológica, podrían haberse seleccionado por estar ligados al gen implicado. La consecuencia de esto puede llevar a la acumulación de genes letales junto al gen seleccionado, llegando en algunos casos, a la exterminación de la línea seleccionada.

Con BL2 iniciamos una nueva experiencia de selección para comprobar si podíamos aumentar aún más la gran resistencia a Cry1Ab que ya presentaba dicha muestra en la naturaleza. En esta selección partíamos de un grupo de insectos que debían presentar un grado de variabilidad muy superior al de BL1. En tan sólo tres generaciones de selección, el valor de LC<sub>50</sub> aumentó 15 veces. Sin embargo la línea seleccionada se perdió. Con estos resultados hemos demostrado que los individuos de BL2 podían aumentar los valores de resistencia a niveles superiores pero quizá

afectando al compromiso que existe entre el aumento de resistencia y la disminución de la eficacia biológica. Otra explicación para la muerte de estos individuos que presentaban unos niveles de resistencias tan altos podrían ser la selección de genes letales junto con el gen o genes implicados en la resistencia tal y como comentábamos anteriormente. La segunda selección realizada con BL2 fue con el formulado de *B. thuringiensis*, Myx-03604. Inicialmente nuestra voluntad fue seleccionar nuevamente BL2 de manera que una vez estabilizada la resistencia frente a Cry1Ab pudiéramos estudiar la genética y la bioquímica de la resistencia. El motivo de no utilizar la ICP pura fue por el gran gasto que suponía realizar la selección debido al alto nivel de resistencia del que ya partíamos. Además, tras las pruebas de toxicidad realizadas habíamos comprobado la resistencia de BL2 frente a este producto, resultado lógico si se piensa que el producto presenta como ingrediente activo a Cry1Ab. Tras seleccionar durante 10 generaciones con Myx-03604, la LC50 aumentó 9 veces su valor.

Para el estudio de resistencias cruzadas obtenidas tras los procesos de selección, se han realizado ensayos de toxicidad en BL1, tanto en la selección con Cry1Ab como con Cry1Ba. No sorprende observar, en la línea seleccionada con Cry1Ab, que no aumenta el valor de la LC<sub>50</sub> para Cry1Ba ya que tampoco lo hace para el agente selectivo Cry1Ab. Aunque este resultado no indica necesariamente la no existencia de resistencia cruzada, los resultados obtenidos en la línea seleccionada con Cry1Ba frente a Cry1Ab muestran que no existe resistencia cruzada entre Cry1Ab y Cry1Ba ya que, a pesar de obtener éxito en la selección con Cry1Ba, no se observan aumentos en los valores de resistencia para Cry1Ab. El estudio de BL2 en la selección realizada con Cry1Ab mostró escasa resistencia cruzada a Cry1Ac (un factor de 2) y ninguna frente a Cry1Aa. Sin embargo, se produjo un aumento de 8 veces en la LC50 frente a Myx-03604. Pero fue en la selección con Myx-03604 donde se produjeron los resultados más sorprendentes ya que encontramos resistencia cruzada frente a todas las ICPs del grupo Cry1A. Este cambio en la especificidad de la resistencia se debe a que el producto comercial Myx-03604, en contra de la que pensábamos, contenía como ingrediente activo un híbrido entre las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac. Las pruebas de toxicidad con Cry1Aa y Cry1Ac se realizaron mediante el método de hojas de col. Mientras que Cry1Ab se analizó tanto con ensayos de dieta artificial como con ensayos en hojas de col. El hecho de que se obtuviera el mismo resultado entre los dos

tipos de ensayos con la ICP Cry1Ab, nos hizo suponer resultados similares con las otras dos ICPs, Cry1Aa y Cry1Ac.

Comparando los radios de la resistencia obtenidos ( $LC_{50}$  final/ $LC_{50}$  inicial), ponemos observar (Tabla 33) que es en la selección con la Cry1Ab donde se dan los mayores aumentos en la resistencia al producto selectivo. El hecho de que la resistencia aumente menos para el producto selectivo en la selección con Myx-03604, parece llevar a una menor resistencia cruzada. Pero hay que tener en cuenta que BL2 al inicio de la selección con Myx-03604 presentaba un valor de  $LC_{50}$  4 veces inferior al del inicio de la selección con Cry1Ab. Además, su estancia en el laboratorio durante un año podría ser periodo suficiente como para que BL2 presentara menor capacidad de respuesta frente a la selección. Los valores de las pendientes muestra también valores diferentes al inicio de cada una de las selecciones (un valor de 0.43 en la selección con Cry1Ab y un valor de 1.16 en la selección con Myx-03604).

**TABLA 33. Comparación de las resistencias obtenidas en las selecciones con la ICP Cry1Ab y Myx-03604.<sup>a</sup>**

Agente selectivo	Resistencia obtenida	Resistencia cruzada	
		Cry1Ab	Myx-03604
Cry1Ab	15	-	9
Myx-03604	8.5	3	-

<sup>a</sup> Los valores vienen expresados en radio de resistencia obtenido dividiendo el valor de la  $LC_{50}$  final de la cepa entre la inicial.

No es fácil predecir que puede ocurrir en la naturaleza tras la utilización continuada de productos insecticidas a partir de los resultados obtenidos en las experiencias de selección en el laboratorio. Las poblaciones naturales presentan un número de individuos muy elevado, lo que significa una gran variabilidad genética. Por contra, en las experiencias de laboratorio se dispone de un número limitado de individuos, y por tanto de un número limitado de genes. Por tanto no es de extrañar que aunque en las experiencias de laboratorio no encontremos respuesta a la selección, la población natural si tuviera capacidad para desarrollar resistencias. En el laboratorio, y contrariamente a lo que ocurre en la naturaleza, los procesos de selección se realizan controlando el número y el estadio de los individuos.



Generalmente, y debido al tipo de selección realizada en el laboratorio, las resistencias obtenidas suelen tener una base poligénica mientras que en la naturaleza la base genética viene determinada por un sólo gen mayor debido tanto a la dosis utilizada en la selección como al número de individuos implicados en dicha selección (Mckenzie y Batterham, 1994)

Mediante la estima de la heredabilidad del carácter seleccionado hemos podido resumir los resultados obtenidos mediante la selección artificial. La heredabilidad se define como la proporción de la variabilidad fenotípica total que es atribuible a la variabilidad genética (Falconer, 1996), y a pesar de que no nos informa acerca del modo de herencia de un carácter cuantitativo, nos es útil para predecir la respuesta de selección. Sin embargo, la estima de la heredabilidad en una experiencia de selección de resistencia a un insecticida presenta dificultades técnicas, de ahí que Tabashnik en 1992 describió un método para estimar fácilmente la heredabilidad a partir de datos obtenidos tras los experimentos de selección y éstos han sido los que hemos utilizado en nuestro estudio. La tabla 34 muestra la comparación de las diferentes heredabilidades conseguidas en BL1 y BL2 tras las diferentes selecciones artificiales. La heredabilidad estimada tras la realización de las selecciones con Cry1Ab en BL1 y BL2 son 0.023 y 0.382 respectivamente. Comparando los resultados obtenidos en las dos poblaciones, vemos que en BL1 la heredabilidad es 16 veces menor a la conseguida con la población BL2. Sin embargo obtenemos valores de heredabilidad prácticamente iguales en las dos selecciones realizadas en la población BL2 tanto con Cry1Ab como con Myx-03604. El hecho de que la población BL2 fuera seleccionada tras su captura de la naturaleza hace pensar que dispone de mas variabilidad genética para responder a una selección que BL1, que ha ido perdiendo la variabilidad por su estancia en el laboratorio. Un resultado similar obtuvo Tabashnik al comparar dos poblaciones, una de ellas establecida en el laboratorio mucho tiempo con otra capturada de la naturaleza, en poblaciones de *P.xylostella* procedentes de Hawaii (Tabashnik *et al.*, 1992b). La heredabilidad estimada tras la selección en BL1 con Cry1Ba nos muestra un valor mayor a la obtenida con Cry1Ab. Este resultado puede ser explicado por el aumento de variabilidad introducido artificialmente en la población mediante la realización de mutagénesis. Así pues podemos decir que la población BL1 tras su estancia en el laboratorio ha perdido variabilidad genética y por tanto no responde a las selecciones realizadas con diferentes toxinas. De manera que

si queremos obtener una mayor respuesta de selección necesitaremos aumentar la variabilidad, natural o artificialmente. Sin embargo BL2 que presenta suficiente variabilidad genética responde del mismo modo a selecciones realizadas con diferentes agentes selectivos.

**TABLA 34. Heredabilidad conseguida en las diferentes selecciones.**

	Cry1Ab	Cry1Ba	Myx-03604
BL1	0.023	0.152	-
BL2	0.382	-	0.369

Los análisis realizados con  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab en la población BL2 de Filipinas han confirmado los resultados obtenidos por Ferré *et al.* (1991), en la población BL1. De manera que la resistencia específica que presenta la población de Filipinas (tanto BL1 como BL2) frente a Cry1Ab se debe a la ausencia de unión de Cry1Ab a la membrana intestinal de los insectos. Sin embargo, esta unión específica sí se produce en BL2 con las toxina  $^{125}\text{I}$ -Cry1Aa y  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac (Ballester *et al.*, 1996) a pesar de que esta población también es resistente frente a estas toxinas. Sin embargo, las poblaciones resistentes QA y EG no han manifestado unión a Cry1Ab y Cry1Ac. Estudios recientes (datos no mostrados) han puesto de manifiesto la unión de Cry1Aa al intestino medio de las larvas de estas poblaciones resistentes por lo que se confirma la existencia de un segundo receptor específico para la Cry1Aa.

A partir del modelo de receptores que hemos propuesto en este trabajo para la población susceptible de *P. xylostella* pueden entenderse las modificaciones sufridas en las diferentes poblaciones resistentes que han aparecido. Las resistencias encontradas en las poblaciones de Hawaii y de Pennsylvania parecen deberse a modificación drástica y total de modo que afectaría a toda la molécula a la cual se unen las tres ICPs (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac). Sin embargo, en la población de Filipinas la resistencia podría deberse a una modificación menos intensa pero específica que afectaría únicamente al sitio de unión de Cry1Ab de modo que sólo impidiera la unión a esta ICP pero no a Cry1Aa y Cry1Ac.

Los resultados toxicológicos encontrados frente a Cry1Fa en nuestra población y en las poblaciones resistentes de QA y EG apoyan esta idea. QA y EG, que se muestran resistentes frente a Cry1Fa no presentarán unión debido a la modificación en

la molécula que comparte con las tres Cry1A, mientras que la susceptibilidad de BL frente a dicha toxina confirmará la especificidad del cambio producido en la molécula de tal manera que sólo afecta a la unión de Cry1Ab. La realización de experimentos de unión con Cry1Fa no resultan posibles debido a la imposibilidad de marcar esta toxina con <sup>125</sup>I (comunicación personal de M. Adang)., de ahí que se deba inferir el resultado o bien realizar otro tipo de experimentos.

Recientemente se ha caracterizado bioquímicamente una cuarta población resistente de *P.xylostella* procedente de Malasia (Wright *et al.*, 1997). En este caso nos encontramos que el intestino de los insectos de esta población, al igual que la población resistente de Filipinas, presenta unión a las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac pero la unión a Cry1Ab está profundamente disminuida.

La conclusión que puede extraerse, tras los estudios realizados en las diferentes poblaciones es que las resistencias encontradas en las poblaciones de Hawaii y de Pennsylvania siguen un mecanismo diferente al encontrado en las poblaciones de Filipinas y Malasia. Parece lógico pensar que las diferentes resistencias encontradas han aparecido de modo independiente en poblaciones alejadas geográficamente de modo que las poblaciones de Filipinas y Malasia por su proximidad puedan presentar el mismo tipo de resistencia. Lo mismo ocurriría respecto a las poblaciones de Hawaii y Pennsylvania. Las diferencias observadas podrían deberse mas a características propias de la cepa particular que a diferencias del mecanismo básico de resistencia que está operando en ella tal y como ya se apuntaba en la población de Filipinas R2 (Ballester *et al.*, 1994). En la figura 28 se muestran los posibles modelos de receptores para las diferentes poblaciones de *P.xylostella* resistentes estudiadas.

**Tabla 35: Estudio comparativo de la unión a membrana de 4 poblaciones resistentes de *P.xylostella* a las tres toxinas del grupo Cry1A.**

	Filipinas	Hawaii	Pennsylvania	Malasia
Cry1Aa	Unión	Unión	Unión	Unión
Cry1Ab	No unión	No unión	No unión	Poca unión
Cry1Ac	Unión	No unión	No unión	Unión

La característica común encontrada en las cuatro poblaciones estudiadas es la unión de Cry1Aa y la ausencia de unión de Cry1Ab mientras que la unión de Cry1Ac depende de la población estudiada. Estos resultados nos plantean la necesidad de buscar diferentes explicaciones alternativas a la aparición de resistencia además de la ausencia de receptores. Estas alternativas deben buscarse, como comentábamos anteriormente, en los diferentes pasos del modo de acción de las ICPs.

#### **4.- DETERMINACIÓN DEL MODO DE HERENCIA DE LA RESISTENCIA A LAS ICPs DEL GRUPO CRY1A EN *Plutella xylostella*.**

Las bases genéticas de la resistencia a *B. thuringiensis* se han estudiado en cuatro especies de insectos: *P. xylostella*, *H. virescens*, *P. interpunctella* y *L. decemlineata* (Tabashnik *et al.*, 1992a; Hama *et al.*, 1992; Martinez-Ramirez *et al.*, 1995; Sims y Stone, 1991; Gould *et al.*, 1992; McGaughey y Beeman, 1989; Rahardja y Whalon, 1995). Aunque en cada uno de los casos se observaron diferencias a nivel de número de genes implicados o relaciones de dominancia, la característica común en todos los casos fue que la resistencia se transmitía según un modelo autosómico.

Para estudiar la genética de la resistencia en la población resistente de Filipinas (BL2), hemos realizado cruces recíprocos entre parejas de individuos procedentes de las poblaciones resistente de Filipinas (BL2) x S (susceptibles). El hecho de estudiar las F1 de cruces formados por una sola pareja se debe a la posible existencia de individuos heterocigóticos para el gen responsable de la resistencia dentro de las poblaciones. Si la resistencia es completamente recesiva, los heterocigóticos en la cepa susceptible reducirían la mortalidad de la progenie F1, lo que nos llevaría a concluir que la resistencia es parcialmente recesiva. Por el contrario, si la resistencia es dominante, los heterocigotos en la cepa resistente incrementarían la mortalidad de la progenie F1, lo que nos llevaría a concluir que la resistencia es parcialmente dominante. Así pues, este tipo de errores pueden evitarse detectando la variación genética presente en las cepas susceptible (S) y resistente (BL2). Los resultados de toxicidad de la F1, obtenidos y analizados estadísticamente mediante  $\chi^2$ , han puesto de manifiesto que la BL2 presenta una resistencia autosómica, ya que obteníamos valores de toxicidad comparables con independencia de que parental presentara el gen de la resistencia en los cruces. Tras esta comprobación, y eligiendo las 16 familias

mas representativas y se analizó la dominancia para cada una de las toxinas, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. El análisis toxicológico de la descendencia F1 ha mostrado que la resistencia sigue una herencia dominante frente a Cry1Aa ( $h = 0.70$ ) recesiva frente a Cry1Ab ( $h = 0.22$ ) y codominante frente a Cry1Ac ( $h = 0.48$ ). De los 16 cruces de parejas realizados entre R x S frente a Cry1Aa, 5 tenían un rango de mortalidad de 0 a 10% ( lo que significa un 4.6%), 10 tenían un rango de mortalidad de 20 a 77% y 1 presentaba el 92 % de mortalidad. La explicación de estos resultados es que una mutación dominante confiere resistencia a BL2 frente a Cry1Aa. Los datos sugieren que los parentales de BL2 en el cruce eran homocigóticos para un alelo dominante que confería resistencia frente a Cry1Aa en las 5 familias con baja o ninguna mortalidad, homocigóticos susceptibles en la familia que presentaban el 92% de mortalidad, y heterocigóticos en las otros. La resistencia codominante encontrada en BL2 frente a Cry1Ac podría ser resultado de la interacción entre la mutación dominante para la resistencia a Cry1Aa y la mutación recesiva par la resistencia frente a Cry1Ab.

El hecho de encontrarnos parentales heterocigotos u homocigotos recesivos en el estudio de la resistencia con Cry1Aa, pone de manifiesto que la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg y por tanto no está fijado el alelo mutante del gen de la resistencia para Cry1Aa. Explicaciones semejantes permiten explicar las ligeras diferencias encontradas en los resultados obtenidos en el estudio de la resistencia frente a Cry1Ab y Cry1Ac.

Teniendo en cuenta el modelo de receptores propuesto para *P. xylostella* (Ballester *et al.*, 1996), la población de Filipinas (BL2) no presenta correlación entre las tres toxinas Cry1A ni tampoco con Cry1Fa por lo que necesita dos o mas loci independientes para explicar la resistencia a las tres toxinas Cry1A y al menos otra mutación adicional para la resistencia a Cry1Fa. El hecho de que en la F<sub>1</sub> de la familia 1 de S x BL2 se encontrara una mortalidad de 0 frente a Cry1Aa y de 100% frente a Cry1Ab, nos hace pensar que la resistencia tampoco está correlacionada significativamente entre Cry1Aa y Cry1Ab. Sin embargo la población resistente de Hawaii (QA) muestra una fuerte correlación entre la resistencia a Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa Hawaii (Tabashnik *et al*, 1997 PNAS ).

Podemos decir que la resistencia encontrada en la población de Filipinas (R2) presenta un control multilocus de estrecho espectro que no es siempre recesivo y no está asociado con la reducción de unión a membrana, mientras que las poblaciones de

Hawai y Pensilvania presentan una mutación recesiva asociada con la reducción de unión a membrana.

Tanto la no fijación del gen o genes implicados en la resistencia como la menor eficacia biológica de los individuos resistentes, hacen que BL2, a pesar de haber sido seleccionada, presente individuos heterocigotos. Estos heterocigotos, en el caso de la Cry1Aa, pueden cruzarse entre sí y segregar cierta proporción de individuos homocigotos susceptibles. Este tipo de individuos morirá si seguimos aplicando una presión de selección positiva, de manera que los parentales, tras el proceso de selección serán resistentes, tanto en homocigosis como en heterocigosis (siempre que la selección permita su supervivencia). Sin embargo, si dejamos de aplicar la presión de selección, los individuos susceptibles segregados a partir de los heterocigotos presentes en la población, llegarán a estado adulto, se reproducirán y dejarán un mayor número de descendientes (debida a su mayor eficacia biológica) aumentando así la frecuencia de homocigotos susceptibles en la población. En el caso de Cry1Ab la restauración de la resistencia se realizará más lentamente debido a que la resistencia sigue una herencia de tipo recesivo. Sin embargo, en la selección con Cry1Ac (resistencia codominante) vamos a tener mayor número de individuos heterocigotos en cada generación por lo que en ausencia de selección la reversión de la resistencia se producirá más rápidamente. Además, podremos encontrarnos con homocigotos recesivos incluso cuando estemos realizando la selección.

Los estudios realizados hasta el momento sobre resistencia cruzadas y herencia de la resistencia (McGaughey y Whalon, 1992; Tabashnik *et al.*, 1994), han permitido investigar acerca de las estrategias a seguir para retrasar la aparición de resistencias. Por ejemplo, se puede utilizar una combinación de toxinas de *B.thuringiensis* si cada gen o genes de la resistencia confiere dicha resistencia sólo a una o a pocas toxinas de *B.thuringiensis*. La estrategia de los refugios es la más recomendada especialmente si el tipo de herencia de la resistencia es recesiva. De ahí que el hecho de que la mayoría de estudios realizados hasta el momento (Tabashnik *et al.*, 1994; Ferré *et al.*, 1995), hayan mostrado que la herencia de la resistencia a *B. thuringiensis* es parcial o totalmente recesiva suponga una gran ventaja a la hora de utilizar *B. thuringiensis* como insecticida biológico para el control de plagas. Cualquier tendencia a la restauración de susceptibilidad a una toxina durante la selección con otra toxina podría incluso mejorar el éxito de la táctica. Sin embargo, el número de toxinas que

pueden ser efectivas contra cualquier cepa resistente podría ser bastante limitada, lo cual supone la necesidad de usar *B.thuringiensis* juiciosamente.

## 5.- IMPORTANCIA DE LOS DIFERENTES DOMINIOS PRESENTES EN LAS ICPs DE *Bacillus thuringiensis* EN LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD.

El conocimiento de la relación dominio-función en las proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* supone una gran ayuda a la hora de decidir cual de estas proteínas conviene utilizar para prevenir, o al menos posponer, el desarrollo de resistencias en poblaciones de insectos plaga. Este tipo de estudios pueden realizarse tanto sobre toxinas mutantes (mediante delección o sustitución de algún aminoácido), como sobre proteínas quimeras (mediante la sustitución de una parte de la molécula por otra homóloga. La herramienta utilizada por la naturaleza *in vivo* para la obtención de toxinas quimeras es la recombinación de los genes que traducen para ICPs. Pero esta recombinación también se ha realizado *in vitro* por diferentes grupos de investigación. La figura 29 muestra algunas de las toxinas quiméricas producidas por la empresa CPRO-DLO y proporcionadas a nuestro laboratorio. El estudio toxicológico realizado con éstas toxinas nos ha permitido establecer la relación dominio-toxicidad en *P. xylostella*.

Es tentador correlacionar regiones con baja homología de secuencia con diferentes especificidades insecticidas, y aquellas con alta homología de secuencia con actividades insecticidas solapadas de ahí que se hayan hecho comparaciones de secuencias de aminoácidos entre diferentes ICPs. La comparación de los tres dominios de la proteína (Fig 29) revela una limitada homología entre Cry1Ca y Cry1Ea, en el dominio II (aproximadamente del 50%) mientras que en los I y III la homología es del 68% y 86% respectivamente. Esto está en concordancia con la idea de que el dominio II está directamente relacionado con la unión a un receptor, como sugiere Li *et al.*, (1989) mediante la estructura tridimensional de Cry3A, jugando un papel crucial en el espectro de actividad de las proteínas cristalinas (Ge *et al.*, 1989; Ge *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992).

Como cabría esperar de las referencias bibliográficas, los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que el dominio II está implicado en la especificidad de Cry1Ca en *P. xylostella*. El fragmento de F26, un híbrido compuesto por los dominios I y III de Cry1C y el dominio III de Cry1Ea es, al igual que Cry1Ca, altamente activa contra este insecto. Sin embargo, tanto Cry1Ea como G27, el híbrido complementario de F26, no eran eficaces contra larvas susceptibles de *Plutella xylostella* o sólo a altas concentraciones. Todos estos resultados indican que una toxina nueva obtenida, bien por mutación o por recombinación artificial en el laboratorio, que contenga el dominio II de la Cry1Ca, resultará tóxica frente a larvas susceptibles de *P. xylostella*

Dominio I	Dominio II	Dominio III	
Cry1Ca	Cry1Ca	Cry1Ea	F26
Cry1Ea	Cry1Ea	Cry1Ca	G27
Cry1Ac	Cry1Ac	Cry1Ab	Cry1Ab*
Cry1Ab	Cry1Ab	Cry1Ca	H04
Cry1Ac	Cry1Ab	Cry1Ab	SAM2

**Fig 28. ICPs quiméricas obtenidas mediante recombinación y proporcionadas por la empresa Warenninger.**

Sin embargo, se conocen dos casos en los que proteínas no tóxicas frente a insectos, han sido capaces de unirse a las proteínas de sus membranas intestinales (BBMV). El primero es el de *S. frugiperda* frente a Cry1Ac, descrito por Garczynski *et al.*, (1991) y el segundo con *S. exigua* frente a Cry1Ea descrito por Bosch *et al.*, (1994).

Mediante experimentos de competencia entre <sup>125</sup>I-Cy1Ca y F26 y G27 (datos no publicados) hemos podido observar que F26 compartía el mismo lugar de unión a membrana con Cry1Ca pero no ocurría lo mismo con G27. El hecho de que G27 posea el dominio II de Cy1Ea explica su no competencia por Cry1Ca. Masson *et al.*,



(1995) observaron que la toxina Cry1Ea no unía al intestino de larvas de *Plutella xylostella* tanto en poblaciones susceptible como resistentes y por tanto era esperable encontrar el mismo resultado con G27.

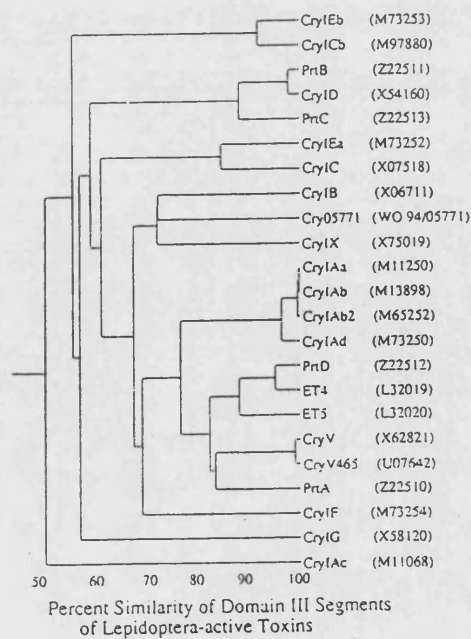
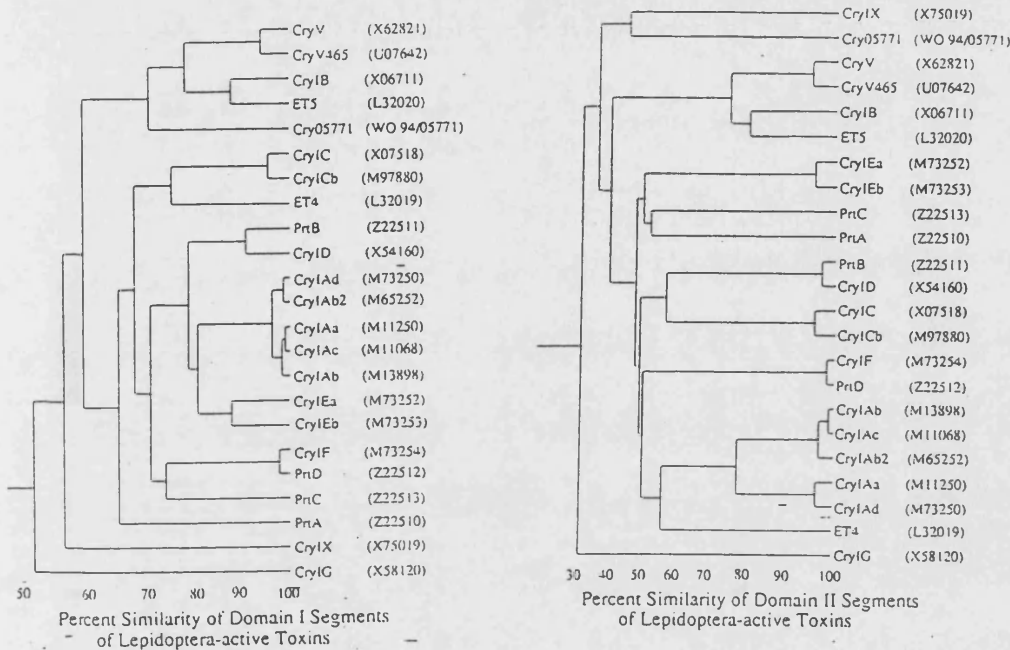
En la bibliografía existente hasta ahora se han descrito casos en los que el dominio III está implicado en la especificidad de una ICP hacia un insecto, en concreto, la toxina Cry1Ca frente a *S.exigua* y *M. brassicae* (Bosch *et al.*, 1994). La posible explicación aportada por los autores es que, aunque el dominio II de Cry1Ea puede unir a las membranas intestinales de *S.exigua* y *M.brassicae*, se necesita el dominio III de la Cry1Ca para estabilizar el fragmento tóxico en el intestino de los insectos.

El estudio de toxicidades realizado en larvas resistentes de *P. xylostella* ha resultado de gran utilidad para descubrir la importancia de los distintos dominios en la determinación de la toxicidad y la resistencia. Los estudios se realizaron en larvas resistentes de *P. xylostella* antes y después de su selección en el laboratorio con el compuesto Myx-03604. La ICP analizada antes de la selección fue Cry1Ab\*, que era Cry1Ac pero con el dominio III de la Cry1Ab. El hecho de que la resistencia que presentaba la población fuera específica para Cry1Ab, nos permitiría conocer la importancia de la sustitución en la ICP. Los análisis de toxicidad mostraron que la población resistente resultaba susceptible a Cry1Ab\*, por lo que se deducía que la sustitución del dominio III de la Cry1Ac por el de Cry1Ab no producía resistencias cruzadas. El dominio II era quien determinaba la toxicidad frente a *P.xylostella* y en este caso era el de Cry1Ac.

Tras la selección con Myx-03604, se querían analizar las nuevas ICPs, H04 y SAM2. H04 era Cry1Ab con el dominio III sustituido por Cry1Ca, mientras que SAM2 era Cry1Ab con el dominio I sustituido por el de Cry1Ac. Mediante estos análisis se quería comprobar que los dominios I y III no determinaban la toxicidad. El dato de H04 mostró una resistencia cruzada para dicha toxina, no encontrándose pues una toxicidad similar a la encontrada con Cry1Ca. Aunque este valor no excluía un potencial papel del dominio I en la determinación de la especificidad, se asume que el dominio I ha sido implicado en la formación del poro (Grochulski *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1991).

El estudio con la toxina SAM2 no se realizó ya que no nos iba a permitir comprobar la posible acción del dominio II ya que con la selección, la población pasó

de presentar una resistencia específica (a Cry1Ab) a una generalizada (frente a todas las Cry1As) no pudiéndose asignar a un dominio determinado la aparición de la resistencia frente a dicha proteína. La resistencia cruzada encontrada frente a H04 nos confirmó nuevamente que tanto por un cambio artificial, como la construcción de toxinas quiméricas, o natural como la mutación o mutaciones se deben a una alteración entre la interacción del dominio II de las ICPs con este insecto.



**Fig 29: Relaciones evolutivas entre toxinas de *B.thuringiensis* comparando las secuencias primarias de las 50 toxinas completas. Entre paréntesis aparecen los números clave de la base de datos GenBank de donde fueron obtenidas.(Thompson *et al.*, 1995)**

Cry1Ab 101 EMRIQFNDMN SALTTAIFLF AVQNYQVPLL SVYVQAANLH LSVLRDVSVF 150  
 Cry1Ac 101 EMRIQFNDMN SALTTAIFLL AVQNYQVPLL SVYVQAANLH LSVLRDVSVF 150  
 Myx 101 EMRIQFNDMN SALTTAIFLL AVQNYQVPLL SVYVQAANLH LSVLRDVSVF 150

Cry1Ab 151 GQRWGFDAAT INSRYNDLTR LIGNYTDHAV RWYNTGLERV WGPDSRDWIR 200  
 Cry1Ac 151 GQRWGFDAAT INSRYNDLTR LIGNYTDYAV RWYNTGLERV WGPDSRDWVR 200  
 Myx 151 GQRWGFDAAT INSRYNDLTR LIGNYTDYAV RWYNTGLERV WGPDSRDWIR 200

Cry1Ab 201 YNQFRRELTL TVLDIVSLFP NYDSRTYPIR TVSQLTRIIY TNPVLENFDG 250  
 Cry1Ac 201 YNQFRRELTL TVLDIVALFP NYDSRRYPIR TVSQLTRIIY TNPVLENFDG 250  
 Myx 201 YNQFRRELTL TVLDIVALFP NYDSRRYPIR TVSQLTRIIY TNPVLENFDG 250

Cry1Ab 251 S..FRGSAQG IEGSIRSPHL MDILNSITYY TDAHRGEYYW SGHQIMASPV 300  
 Cry1Ac 251 S..FRGSAQG IERSIRSPHL MDILNSITYY TDAHRGYYYW SGHQIMASPV 300  
 Myx 251 S..FRGSAQG IERSIRSPHL MDILNSITYY TDAHRGYYYW SGHQIMASPV 300

Cry1Ab 301 GFSGPEFTFP LYGTMGNAAP QQRIVAQLGQ GVYRTLSSSTL YRR.PFNIGI 350  
 Cry1Ac 301 GFSGPEFTFP LYGTMGNAAP QQRIVAQLGQ GVYRTLSSSTF YRR.PFNIGI 350  
 Myx 301 GFSGPEFTFP LYGTMGNAAP QQRIVAQLGQ GVYRTLSSSTF YRR.PFNIGI 350

Cry1Ab 351 NNQQLSVLDG TEFAYGT.SS NLPSAVYRKS GTVDSLDEIP PQNNNVPPRQ 400  
 Cry1Ac 351 NNQQLSVLDG TEFAYGT.SS NLPSAVYRKS GTVDSLDEIP PQNNNVPPRQ 400  
 Myx 351 NNQQLSVLDG TEFAYGT.SS NLPSAVYRKS GTVDSLDEIP PQNNNVPPRQ 400

Cry1Ab 401 GFSHRLSHVS MFRSGFSNSS VSIIRAPMFS WIHSANFNN IIPSSQITQI 450  
 Cry1Ac 401 GFSHRLSHVS MFRSG. SSSS VSIIRAPMFS WIHSAEFNN IASDSITQI 450  
 Myx 401 GFSHRLSHVS MFRSGFSSSS VSIIRAPMFS WIHSANFNN IIPSSQITQI 450

Cry1Ab 451 PLTKSTNLGS GTSVVKGPGF TGGDILRRTS PGQISTLRVN ITAPL . . . . . 500  
 Cry1Ac 451 PAVKG.NFLF NGSVISGPGF TGGDLVRLNS SGNNIQNRGY IEVPIHFPST 500  
 Myx 451 PLTKSTNLGS GTSVVKGPGF TGGDILRRTS PGQISTLRVN ITAPL . . . . . 500

Cry1Ab 501 SQRYRVRIRY ASTTNLQFHT SIHGRPINQG NFSATMSSGS NLQSGSFRHL 550  
 Cry1Ac 501 STRYRVRVRY ASVTPIHLNV NWNSSIFNS TVPATATSLD NLQSGSFRHL 550  
 Myx 501 SQRYRVRIRY ASTTNLQFHT SIHGRPINQG NFSATMSSGS NLQSGSFRHL 550

Cry1Ab 551 GFTTPFNFSN GSSVFTLSAH VFNSGNEVYI DRIEFVPAEV TFEAEYDLER 600  
 Cry1Ac 551 ESANAFTSSL GNIV . . . GVR NFSGTAGVII DRFEFIPVTA TLEAEYNLER 600  
 Myx 551 GFTTPFNFSN GSSVFTLSAH VFNSGNEVYI DRIEFVPAEV TFEAEYDLER 600

**Fig 31:Alineación de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y del híbrido Myx-03604. Los residuos cambiados se encuentran marcados en negro.**

Similares resultados obtuvo Tabashnik *et al.*, (1996), en una población resistente de *P. xylostella* procedente de Hawaii en la que comprobó que la correlación observada entre la resistencia cruzada y la similaridad entre ICPs, fue mayor para el dominio II que para los dominios I y III. Consideraciones estructurales y resultados experimentales con otros insectos (Lu *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1990 y Wu., 1996) sugieren que las regiones de los bucles del dominio II están implicados en la unión y en la especificidad.

El producto Myx-03604, al igual que H04 y SAM2, se muestra muy efectivo frente a la población susceptible de *P. xylostella*. Myx-03604, utilizado para la selección en BL2, es un compuesto formado artificialmente a partir de Cry1Ab y Cry1Ac de manera que es la ICP Cry1Ab a la cual se le han sustituido algunos residuos de Cry1Ac en los dominios I y II. Como puede observarse, las mayores diferencias entre Cry1Ab y Cry1Ac se encuentran en el dominio III sin embargo, el producto Myx-03604 no presenta en este dominio ningún residuo modificado.

La resistencia cruzada entre diferentes toxinas parece ser sólo atribuible a que las toxinas comparte el lugar de unión a la membrana que ha sido modificado. Hasta ahora no se ha descrito ningún caso de resistencia cruzada debida a una alteración en el proceso proteolítico.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones son las siguientes:

1.- Toxicidad de las ICP de *B.thuringiensis* frente a una población susceptible de *P.xylostella*.

1.1.- Las ICP Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ba son las proteínas más activas contra *P.xylostella*, causando gran mortalidad. Cry1Aa, Cry1Ca y Cry1Fa resultan menos eficaces, pero únicamente Cry1Ea resulta no ser tóxica frente a este insecto.

1.2.- Los formulados comerciales utilizados provocan una mortalidad inferior a la esperada teniendo en cuenta la toxicidad encontrada en las proteínas puras que componen el producto.

2.- Análisis de la población resistente procedente de Filipinas (R2) mediante su estudio toxicológico.

2.1.- La población de Filipinas (R2) presenta resistencia específica frente a la ICP Cry1Ab y frente al producto Myx-03604.

2.2.- No presenta resistencia cruzada frente a Cry1Fa.

3.- Capacidad de *Plutella xylostella* procedente de Filipinas (R1 y R2) para desarrollar resistencias frente a Cry1Ab, Cry1Ba y Myx-03604.

3.1.- R1 ha perdido la variabilidad genética necesaria para responder a las selecciones con Cry1Ab y Cry1Ba debido a su larga permanencia en el laboratorio.

3.2.- R2 presenta variabilidad genética suficiente para responder rápidamente a la selección tanto con Cry1Ab como con myx-03604.

3.3.- No existe resistencia cruzada entre Cry1Ab y Cry1Ba.

3.4.- Existe una mínima resistencia cruzada entre las toxinas Cry1A tras seleccionar R2 con Cry1Ab embargo se observan altos valores de resistencia cruzada entre las ICPs del grupo Cry1A y el producto comercial Myx-03604.

4.- Herencia de la resistencia de *Plutella xylostella* procedente de Filipinas (R2) frente a las ICPs del grupo Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac) tras la selección con Myx-03604.

4.1.- La herencia de la resistencia sigue tres modelos diferentes en cada una de las ICPs de tal manera que: la resistencia frente a Cry1Aa es un carácter dominante, la resistencia frente a Cry1Ab es un carácter recesivo y la resistencia a Cry1Ac es un carácter codominante.

5.- Modelo de receptores propuesto para *Plutella xylostella*.

5.1.- Las ICPs Cry1As (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac) junto con Cry1Fa comparten un lugar de unión a la membrana de insectos.

5.2.- La resistencia encontrada en la población de Filipinas a Cry1Ab se debe a un cambio menor en el lugar de unión a la membrana mientras que las resistencias encontradas frente a Cry1Aa y Cry1Ac deben explicarse mediante otros mecanismos (proteolisis, activación, etc).

5.3.- La resistencia encontrada para Cry1Ab y Cry1Ac en las poblaciones QA (Hawaii) y EG (Pensilvania) se deben a la ausencia de unión a la membrana.

---

BIBLIOGRAFÍA



- ABOTT, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of insecticide. **J. Econ. Entomol.** **18**, 265-267.
- ADAMS, L. F., BROWN, K. L. Y WHITELEY H. R. (1991). Molecular cloning and characterisation of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. **Journal of Bacteriol.** **173**, 3846-3854.
- ADANG, M.J. Y SPENCE (1982). Biochemical comparisons of the peritrophic membranes of the lepidopterans *Orygia pseudotsugata* and *Manduca sexta*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **73B**, 645-649.
- ADANG, M. J., STAVEN, M.J., ROCHELEAU, T. A., LEIGHTON, J., BARKER, R. F. Y THOMPSON, D.V. (1985). Characterised full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. **Gene** **36**, 289-300.
- ADANG, M.J. (1991). *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: Gene structure, action and visualisation. En: **Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors**. (Editado por K. Maramorosch), pp. 3.24. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- AGAISSE, H. Y LERECLUS, D. (1994a). Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* CryIIIa toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spoA* mutant. **Journal of Bacteriol.** **176**, 4374-4741.
- AGAISSE, H. Y LERECLUS, D. (1994b). Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the CryIIIa toxic gene of *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbiol.** **13**, 97-197.
- ANGUS, T. A. (1956). General characteristics of certain insect pathogens related to *Bacillus cereus*. **Canadian Journal of Microbiol.** **2**, 111-121

- ARANTES, O. Y LERECLUS, D. (1991). Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene** **108**, 115-119.
- ARGENTINE, J. A., J.M. CLARK Y H. LIN (1992). Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle. **Pestic. Biochem. Physiol.**, **44**, 191-207
- ARONSON, A.I. (1993). The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. **Mol. Microbiol.**, **7(4)**, 489-496.
- ARONSON, A.I. (1995). The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61(11)**, 4057-4060.
- ASANO, S., L.S. INDRASITH Y H. HORI (1995). Synergism in larvicidal activity between supernatant and pellet from *Bacillus thuringiensis* culture. **Appl. Entomol. Zool.**, **30(1)**, 153-158.
- 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 Cry1Ab. **Biocontrol, Sci. Technol.** **4**, 437-443.
- BALLESTER, V., F. GRANERO, J.L. MÉNSUA, Y J. FERRÉ (1996). Binding of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins to a common receptor in *Plutella xylostella*: implications on resistance management. En: Abstracts from the **29th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, Córdoba, Spain, p. 5.
- BARTON, K.A., H.R. WHITELEY Y N.S. YANG (1987). *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiol.**, **85**, 1103-1109.

- 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., D., MILLER, C., KOLLER Y R. HOLLINGWORTH (1995). Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1B toxin in cottonwood leaf beetle selected for resistance to Cry3A. En: Abstracts from the **28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, Ithaca, New York, p. 5.?????. Esta o la de el solo
- BAUM, J. A. Y MALVAR, T. (1995). Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. **Molec. Microbiol.**, **18**, 1-12.
- 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.
- 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.
- BHATTACHARYA, M., B.A. PLANTZ, J.D. SWANSON-KOBLER, Y K.W. NICKERSON (1993). Nonenzymatic glycosylation of Lepidoptera-active *Bacillus thuringiensis* protein crystals. **Appl. Env. Microbiol.**, **59**, 2666-2672.
- BIBER, J., B. STIEGEN, W. HAASE Y H. MÜRER (1981). A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behavior of lysosomal markers. **Biochem. Biophys. Acta** **647**, 169-176.
- BOCH, D., B. VISSER Y W.J. STIEKEMA (1994a). Analisis of non-active engineere *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **FEMS** **118**, 129-134.

- BOCH, D., B. SCHIPPER, H. VAN DER KLEIJ, R. A. DE MAAGD Y W.J.STIEKEMA (1994b). Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. **Biocontrol, Sci. Technol.** **12**, 915-918.
- 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 Cry1Aa. **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. **Annal. Biochem.** **72**, 248-254.
- BRADLEY, D., HARKEY, M. A., KIM, M.-K., BIEVER, K. D. Y BAUER, L. S. (1995). The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* sp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. **J. Invertebr. Pathol.**, **65**, 162-173.
- BRAVO, A., K. HENDRIKX, S. JANSSENS Y M. PEFEROEN (1992). Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **J. Invertebr. Pathol.**, **60**, 237-246.
- BULLA, L. A. JR. DAVIDSON, L. Y., KRAMER, K. J. Y JONES, B. L. (1979). Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **91**, 1123-1130.
- CARLTON, B. C., C. GAWRON-BURKE Y T.B.JOHNSON (1990). Exploiting the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* for the creation of new bioinsecticides. **Vth International Coloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control**, Adelaide, Australia.

- 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 Dekkar Inc., New York, USA.
- CARLTON, B.C. Y GONZALEZ, J.M. (1985). The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. In **T Molec. Biol. of the Bacilli, Vol. II.** (de. D.A. Dubnau), pp. 211-249. Academic Press Inc. New York.
- 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**, 99-1005.
- CHAMBERS, J., A. JELEN, M. GILBERT, C.S. JANY, T.B. JOHNSON Y C. GAWRON-BURKE. (1991). Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Journal of Bacteriol.**, **173**, 3966-3976.
- CHILCOTT, C. N. Y WIGLEY, P. J. (1994). Opportunities for finding new *Bacillus thuringiensis* strains. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **49**, 51-57.
- CHUNJATUPORNCHAI, W., HÖFTE, H., SEURIUCH, J., ANGSATHANASOBAT, C. Y VAECK, M. (1988). Common features of new *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. **European Journal of Biochem.**, **173**, 9-16.
- CRICKMORE, N., C. NICHOLLS, D.J. EARP, T.C. HODGMAN Y D.J. ELLAR (1990). The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressig novel entomocidal delta endotoxin combinations. **Biochem. J.**, **270**, 133-136.
- CRICKMORE, N., E.J. BONE, J.A. WILLIAMS Y D.J. ELLAR (1995). Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity

of in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **131**, 249-254.

DE BARJAC, H. Y BONNEFOI, A. (1968). A classification of strain of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. **J. Invertebr. Pathol.**, **2**, 335-347.

DE BARJAC, (1981). Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In **Microbial Control of Pests and Diseases 1979-1980** (de. H. D. Burgess), pp. 35-43. Academic Press, London.

DE MAAGD, R., M.S.G. KWA, H. VAN DER KLEI, T. YAMAMOTO, B. SCHIPPER, J.M. VLAK, W.J. STIEKEMA Y D. BOCH (1996a). Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ab results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62(5)**, 1537-1543.

DE MAAGD, R., H. KLEI, P.L. BAKKER, W.J. STIEKEMA Y D. BOCH (1996b). Different domains of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62(8)**, 2753-2757.

DE SOUZA, M.T., LECADET, M.-M. Y LERECLUS, D. (1993). Full expression of the cryIII<sub>A</sub> toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **Journal of Bacteriol.**, **175**, 2952-2960.

DELÉCLUSE, A., C. BOURGOUIN, A. KLIER Y G. RAPOPORT (1988). Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis* toxins encoded by two different genes. **Mol. Gen. Genet.**, **214**, 42-47.

DELÉCLUSE, A., J.-F. CHARLES, A. KLIER Y G. RAPOPORT (1991). Deletion by *in vivo* recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polipeptide from

- Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* is not essential for mosquitocidal activity. **J. Bacteriol.**, **173(11)**, 3374-3381.
- DENOF, P., S. JANSENS, M. PERFEROEN, 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.
- DENOF, P., S. JANSENS, M. PERFEROEN, D. DEGHEELE Y J. VAN RIE (1993b). Biotinilation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**, 1821-1827.
- DONOVAN, W. P., DANKOCSIK, C. C., GILBERT, M. P., GAWRON-BURKE, M. C. GROAT, R. G. Y CARLTON, B. C. (1988a). Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein, an insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Journal of Biological chemistry** **263**, 561-567.
- DONOVAN, W. P., RUPAR, M. J., SLANEY, A.C., MALVAR, T., M. P., GAWRON-BURKE, M. C. Y JOHNSON, T. B. (1992). Characterisation of two genes encoding from *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. **Applied and Environ. Microbiol.** **58**, 3921-3927.
- 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.
- DUBOIS, N. R. Y D. H. DEAN (1995). Synergism between Cry1A insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Limantriidae) larvae. **Environ. Entomol.**, **24(6)**, 1741-1745.

DULMAGE, H.T. (1981). Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. En **Microbial Control of Pets and Plant Diseases 1970-1980** (de H.D. Burgess), pp. 193-223. Academic Press, London.

EDWARDS, D. L., J. PAYNE Y G. G. SOARES (1990). U.S. Patent 4, 948-734.

ELLAR, D. J., B.H. KNOWLES, J. CARROL, J. HORSNELL, M. Z. HAIDER, W. AHMAD, C.N. NICHOLLS, G. ARMSTRONG y C. HODGMAN (1990). Genetic and Biochemical studies of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* entomocidal  $\delta$ -endotoxins. En: **Bacterial Protein Toxins**. Zbl. Bakt. Suppl. 19 edit (De. Rappouli, R., J. Alouf, J. Freer, F. Fehrenbach, T. Wadstrom y B. Witholt), pp. 499-506. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart y New York.

ENDO, Y. Y J. NISHITSUTSUJI-UWO (1980). Mode of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. **J. Invertebr. Pathol.**, **36**, 90-103.

ENGLISH, L.H. Y L.C. CANTLEY (1986). Delta-endotoxin is a potent inhibitor of the (Na, K)-ATPase. **J. Bio. Chem.**, **261**, 1170-1173.

ESCRICHE, B. (1995). Estudio de la acción de varias proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en poblaciones de cinco especies de insectos plaga. 1.- Determinación del modelo de receptores. 2.- Análisis de poblaciones resistentes. Tesis Doctoral. Universitat de València.

ESCRICHE, B., A.C. MARTINEZ-RAMIREZ, 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* Cry1Ab crystal protein. **J. Invertebr. Pathol.**, **65**, 318-320.
- ESCRICHE, B., J. FERRÉ y F.J. SILVA (1995b). Occurrence of a common receptor in *Mamestra brassicae*, *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera exigua* for the insecticidal crystal proteins Cry1A from *Bacillus thuringiensis*.
- ESTADA, U. y J. FERRÉ (1994). Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera:Nocturnidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**, 3840-3846.
- FALCONER, D.S. (1996). Introduction to quantitative genetics. 4rd. Ed. Logman, New York.
- FAST, P.G., D.W. MURPHY Y S.S. SHOHI (1978). *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. Evidence that toxin acts at the surface of susceptible cells. **Experientia**, **34(6)**, 762-762.
- FEDERICI, B.A., P. LÜTHY Y J.E. IBARRA (1990). The parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*: structure, protein composition and toxicity. En: **Bacterial control of mosquitos and black flies: Biochemistry, genetics and applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus***. Editado por H. de Barjac y S. Sutherland), Rutgers University Press, New Brunswick, N.J., USA.
- FEITELSON, J.S., J. PAYNE Y L. KIM (1992). *Bacillus thuringiensis* : Insects and beyond. **Bio/Technology**, **10**, 271-275.
- 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.

- FELDMANN, F., A. DULLEMANS Y C. WAALWIJK (1995). Binding of the Cry4D toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* to larval dipteran midgut proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**(7), 2601-2605.
- FERRÉ, J., J. VAN RIE, S. JANSENS Y M. PEFFEROEN (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.
- FERRÉ, J., B. ESCRICHE, Y. BEL Y J. VAN RIE (1995). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, **132**, 1-7.
- FRENCH-CONSTANT, R.H. (1994). The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, **24**(4), 335-245.
- FINNEY, D.J. (1962). Probit analysis. pp. 50-80. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- FISCHHOFF, D.A., K.S. BOWDISH, F.J. PERLAK, P.G. MARRONE, S.M. McCORMICK, J.G. NIEDERMEYER, D.A. DEAN, K. KUSANO-KRETZMER, E.J. MAYER, D.E. ROCHESTERY R.T. FRALEY (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, **5**, 807-813.
- FORCADA, C., ÁLCACER, E., M.D. GARCERÁ Y R. MARTINEZ (1996). Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Archives of insect Biochem. and Physiol** **31**, 257-272.
- FUJIMOTO, H., K. ITOH, M. YAMAMOTO, J. KYOZUKA Y K. SHIMAMOTO (1993). Insect resistant rice generated by introduction of a modified  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology**, **11**, 1151-1155.

- 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.
- GE, A.Z., SHIVAROVA, N.I. Y DEAN, D. (1989). Location of the *Bombix mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**, 4037-4041.
- GE, A.Z., RIVERS, D., MILNE R.E. Y DEAN, D. (1991). Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. **J. Biol. Chem.** **266**, 17954-17958.
- GEISER, M., S. SCHWEITZER Y C. GRIMM (1986). The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the *kurdhl* gene of subspecies *kurstaki* HD-1. **Gene** **48**, 109-118.
- GELERTNER, W.D. (1990). MPV Bioinsecticide: a bioengineered, bioencapsulated product for control of lepidopteran larvae. **Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control**, Adelaide, Australia.
- GONZALEZ, J. M., BROWN, B. J. Y CARLTON, B.C., (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for  $\delta$ -endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, **79**, 6951-6955.
- GOULD, F., A.C. MARTINEZ-RAMIREZ, 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.
- GOULD, F., A. ANDERSON, A. REYNOLDS, L. BUMGARDNER Y W. MOAR (1995). Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to some *Bacillus thuringiensis* toxins. **J. Econ. Entomol.**

- GRANERO, F., BALLESTER, V. AND FERRÉ, J. (1996). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella*. **BBRC 224**, 779-783.
- GREEN, M., M. HEUMANN, R. SOKOLOW, L.R. FOSTER, R. BRYANT Y M. SKEELS (1990). Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: An epidemiological study, Oregon 85-86. **Am. J. Public Health 80(7)**, 848-852.
- GROCHULSKI, P., L. MASSON, S. BOROSOVA, M. PUSZTAI-CAREY, J.L. SCHWARTZ, R. BROUSSEAU Y M. CYGLER. (1995). *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **J. Mol. Biol. 254**, 447-464.
- GROETERS, F.R., B.E. TABASHNIK, N. FINSON Y M. W. JONHSON (1993). Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (Lepidoptera:Plutellidae). **J. Econ.Entomol.**, **86**, 1035-1039.
- GROETERS, F.R., B.E. TABASHNIK, N. FINSON Y M. W. JONHSON (1994). Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Evolution**, **48(1)**, 197-201.
- GUEDES, R.N.C., J.O.G. LIMA, J.P. SANTOS Y C.D. CRUZ, (1994). Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots). **Internatl. J. of Pest Management**, **40(1)**, 106.
- 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.
- HARDY, J.E. (1938). *Plutella maculipennis* Curt., its natural and biological control in England. **Bull. Entomol. Res.**, **29**, 343-372.
- HARTL, D.L. (1988). A primer of population genetics, 2nd de. Sinauer, Sunderland, MA.
- HEIMPEL, A.M. Y T.A. ANGUS (1959). The site of action of cristalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. **J. Insect Pathol.**, **1**, 152-170.
- HENNER, D. J., YANG, M., CHEN, E., HELLMISS, R. RODRIGUEZ, H. Y LOW, M. G. (1988). Secuence of the *Bacillus thuringiensis* phosphatidylinositol specific phospholipase C. **Nucleic Acids Research** **16**, 10383.
- HODGMAN, T.C. Y D.J. ELLAR (1990). Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins determined by computilational analysis. **J. DNA sequ. Map.**, **1**, 97-109.
- 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.
- HOFMANN, C., H. VANDERBRUGGEN, H. HÖFTE, J. VAN RIE, S. JANSENS Y H. VAN MELLAERT (1988b). Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin 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.
- HÖFTE, H., J.VAN RIE, S. JANSENS, A. VAN HOUTVEN, VANDERBRUGGEN Y M. VAECK (1988). Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of

three types of Lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **54(8)**, 2010-2017.

HÖFTE, H. Y H.R. WHITELEY (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** **53**, 242-255.

JAQUET, F. R. HÜTTER Y P. LÜTHY (1987). Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**, 500-504.

JENKINS, J.B. (1967). Mutagenesis at a complex locus in *Drosophila* with the monofunctional alkylating agent, ethyl methanesulfonate. **Genetics**, **57**, 783-793.

JOHNSON, D.E., G.L. BROOKHART, K.J. KRAMER, D.B. BARNETT Y W.H. McGAUGHEY (1990). Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*: comparison of midgut proteinases from susceptible and resistant larvae. **J. Inverteb. Pathol.**, **55**, 235-243.

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. N. CRICKMORE Y D.J. ELLAR (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Mol. Microbiol.**, **11(3)**, 429-463.

KNOWLES, B. H., M.R. BLATT, M.TESTER, J.M.HORSNELL, J.CARROLL AND D.J. ELLAR (1989). A cytolytic  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation selective channels in planar lipid bilayers. **FEBS Lett.**, **244**, 259-262.

KNOWLES, B. H. Y J.A.T.DOW (1993). The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanisms of action on the insect gut. **BioEssays**, **15**(7), 469-476).

KNOWLES, B. H AND D.J. ELLAR (1986). Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for var. *kurstaki* lepidopteran-specific  $\delta$ -endotoxin. **J.Cell Sci.**, **83**, 89-101.

KNOWLES, B. H AND D.J. ELLAR (1987). Colloid osmotic lysis is a general feature of mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin with different insect specificity. **Biochem. Biophys. Acta**, **924**, 509-518.

KNOWLES, B. H., P. KNIGHT AND D.J. ELLAR (1991). N-acetyl galactosamine is part of the receptor insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Proc. R. Soc. Lond. B**, **245**, 31-35.

KNOWLES, B. H., C. N. NICHOLLS, G. ARMSTRONG, M.TESTER, Y D.J. ELLAR (1990). Broad spectrum cytolytic toxins made by *Bacillus thuringiensis*. **En: Fifth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control**. pp. 283-287, Society for Invertebrate Pathology, Adelaide, Australia.

KOZIEL, M.G., G.L. BELAND, C. BOWMAN, N.B. CAROZZI, R. CRENSHAW, L. CROSSLAND, J. DAWSON, N. DESAI, M. HILL, S. KADWELL, K. LAUNIS, K. LEWIS, D. MADOX, K. MCPHERSON, M.R. MEGHJI, E. MERLIN, R. RGODES, G.W. WARREN Y S.V. EVOLA (1993). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, **11**, 194-200.

KRIEG, D.R. (1963). Ethyl metanesulfonate-induced reversions of bacteriophage T4 rII<sub>mutans</sub>. **Genetics**, **48**, 561-580.

- KRIEG, A. (1971). Concerning alpha-exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* and of *Bacillus cereus*. **J. Invertebr. Pathol.** **17**, 134-135.
- LAEMILI, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680-685.
- LAMBERT, B., THEUNIS, W., AGUDA, R. VAN AUDENHOVE, K., DECOCK, C., JANSSENS, S., SEURINCK, J. Y PEFEROEN, M. (1992b). Nucleotide sequence of gene CryIIID encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BTI<sub>109</sub>P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Gene** **110**, 131-132.
- LAMBERT, B., L. BUYASSE, C. DECOCK, S. JANSSENS, C. PIENS, S. BERNADETTE, J. SEURINCK, K. VAN AUDENHOVE, J. VAN RIE, A. VAN VLIET Y M. PEFEROEN. (1996). A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. **Appl. Environ. Microbiol.** **62**, 80-86.
- LECADET, M.M. AND 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., MILNE, R.E., GE, A.Z. Y D.H. DEAN (1992). Localisation of a *Bombix mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. **J. Bio. Chem**, **267**, 3115-3121.
- LEE, M.K., F. RAJAMOHAN, F. GOULD, Y D.H. DEAN (1995). Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61(11)**, 3836-3842.
- LEONG, K. L. H., CANO, R.J. Y KUBINSKI, A. M (1980). Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. **Environmental Entomology**, **9**, 593-599.



- LERECLUS, D., C.BOURGOUIN, M.M.LECADET, A.KLIER AND 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.
- LERECLUS, D. LECADET, M.-M., RIBIER, J. Y DEDONDER, R. (1982). Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through II crystalliferous strains. **Molec. and General Genetics**, **186**, 391-398.
- LERECLUS, D., A. DELÉRECLUSE Y M.-M. LECADET. (1993). Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. En: *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: **Theory and Practice** (eds. Entwistle, p., Cory, J. and Higgs, M.), pp. 3-69. John Wiley, Chichester, England.
- LEVINSON, B., K. KASYAN, S. CHIU, T. CURRIER Y J. GONZÁLEZ (1990). Identification of  $\beta$ -exotoxin producton, plasmids encoding  $\beta$ -exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **J. Bacterio.**, **172**, 3172-3179.
- LI, J., J. CARROLL AND D.J. ELLAR (1991). Crystal structure of insecticidal  $\delta$  endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, **535**, 815-821.
- LU, H., F. RAJAMOHAN Y D.H. DEAN. (1994). Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1Aa associated with membrane binding and toxicity to *Bombix mori*. **J. Bacteriol**, **176**, 5554-5559.
- 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 y Co. Inc., Totowa, New Jersey, USA.

- MACINTOSH, S.C., T.B. STONE, R.S. JOKERST AND R.L.FUCHS (1991). Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of selected *Heliothis virescens*. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, **88**, 8930-8933.
- MARRONE, P.G. Y S.C. MACINTOSH (1993). Resistance to *Bacillusthuringiensis* and resistance management. En: *Bacillus thuringiensis, An environmental biopesticide: Theory and practice*, (Editado por P.Entwistle,J.S. Cory, M.J. Baley y S. Higgs), pp. 221-235. John Wiley y sons Ltd.,Chinchester, England.
- MARTINEZ-RAMIREZ, A. C. (1995). Estudio del modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en distintos insectos plaga. Tesis doctoral. Universitat de València.
- MARTINEZ-RAMIREZ, 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 populaton of diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Pestic. Sci.**, **43**, 115-120.
- MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C., S. GONZALEZ-NEBAUER, B. ESCRICHE Y M.D. REAL, (1994). Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* Cry1A-type ICPs. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **201**, 782-787.
- MASSON, L., Y. LU, A. MAZZA, R. BROUSSEAU, Y M.J. ADANG.(1995). The Cry1Ac receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. **J.Bio. Chem.** **270**, 20309-20315.
- MATHAVAN, S., P.M. SUDHA, Y S.M. PECHIMUTHU (1989). Effect of *Bacillus thuringiensis israeliensis* on the midgut cells of *Bombix mori* larvae: A histopathological and histochemical study. **J. Invertebr. Pathol.**, **53**, 217-227.
- 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 the controlling Indianmeal moths (Lepidoptera: Pyraliadae). **J. Econ. Entomol.**, **78**, 1089-1094.
- McGAUGHEY, W.H. Y D. JOHNSON (1987). Toxicity of different serotypes and toxins of *Bacillus thuringiensis* to resistant and susceptible *Indianmeal moths*. **J. Econ. Entomol.**, **80**, 1122-1126.
- McGAUGHEY, W.H. 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 WHALON (1992). Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science**, **258**, 1451-1455.
- McKENZIE, J.A. Y P. BATTERHAM (1994). The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. **TREE**, **9(5)**, 166-169.
- MOAR, W.J., M. PUSZTAI-CAREY, H. VAN FAASEN, D. BOSCH, R. FRUTOS, C. RANG, K. LUO Y M.J. ADANG (1995). Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, **61(6)**, 2086-2092.
- MORRIS, O. N. (1983). Protection of *Bacillus thuringiensis* from inactivation of sunlight. **Canadian Entomologist**, **115**, 1215-1227.
- MULLIN, C.A. Y J.G. SCOTT (1992). Biomolecular basis for insecticide resistance. En **Molecular mechanisms of insecticide resistance. Diversity among insects.** (Editado por American Chemical Society) pp. 1-13. Washington DC. U.S.A.
- MUNDSON, P.J. Y D. RODBARD (1980). LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding system. **Anal. Biochem.**, **107**, 220-239.

- ODDOU, P., H. HARTAMANN Y M. GEISER (1991). Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. **Eur. J. Biochem.**, **202**, 673-680.
- ODDOU, P., H. HARTAMANN, F. RADCKE Y M. GEISER (1993). Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin. **Eur. J. Biochem.**, **212**, 145-150.
- OPPERT, B., K.J. KRAMER, D.E. JONHSON, S.C. MacINTOSH Y W.H.McGAUGHEY (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. **Biochem. Res. Commun.** **198**, 9440-947
- PAO-INTARA, M., C. ANGSUTHANASOMBAT Y S. PANYIM (1988). The mosquito larvicidal activity of 130 kDa  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* var. israeliensis resides in the 72 kDa amino-terminal fragment. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **153**, 294.
- PAYNE, G.T., R.G. BLENK Y T.M. BROWN (1988). Inheritance of permethrin resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Econ. Entomol.**, **81**, 65-73.
- PAYNE, S.M., M.K. KENNEDY, J.B. RANDALL Y H. MEIER. (1993). Use of *Bacillus thuringiensis* isoates active against Hymenopteran pests. **U.S. patent number 5.260058**
- PERFEROEN, M., S. JANSENS, A. REYNAERTS Y J. LEEMANS (1990). Potato plants with engineered resistance against insect attack. En: **Molecular and cellular biology of the potato**. (Editado por M.E. Vaeda y W.C. Park), pp.193-204. C.A.B. international, Wallingford, U.K.
- PERFEROEN, M. (1992). Engeneering of insect-resistance plants with *Bacillus thuringiensis* cystal protein genes. En: **Plant genetic manipulation for crop**

- protection.** (Editado por A. M.R. Gatehouse, V.A. hilder y D. Boulter), pp. 135-153. C.A.B. International, Wallington, UK.
- PERLACK, F.J., R.W. DEATON, T.A. ARMSTRONG, R.L. FUCHS, S.R. SIMS, J.T. GREENPLATE Y D.A. FISCHHOFF (1990). Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*, **8**, 939-943.
- PERLACK, R.L. FUCHS, D.A. DEAN, S.L. McPHERSON Y D.A. FISCHHOFF (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 3324-3328.
- PEDRAFITA, A.C., RAHARDJA, U. Y M. E. WHALON (1995). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Cry3A  $\delta$ -endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, **88(1)**, 21-26.
- PRIEST, F.G., GOODFELLOW, M. Y TODD, C. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. General Microbiol.* **134**, 1847-1882.
- PUSZTAI, M., FAST, P., GRINGORTEEN, L., KAPLAN, H., LESSARD, T. Y CAREY, P. R. (1991). The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. Journal* **273**, 43-47.
- RAHARDJA, U. Y M.E. WHALON (1995). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* CryIII A  $\delta$ -endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, **88(1)**, 21-26.
- RHIM, S.-L., H.J. CHO, B.-D. KIM, W. SCHNTTER Y K. GEIDER (1995). Development of insect resistance in tomato plants expressing the  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Molec. Breeding*, **1**, 229-236.
- ROUSH, R.T. Y J.A. McKENZIE (1987). Ecological genetics of insecticide, and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.*, **32**, 361-380.

- ROUSH, R.T. Y F.W. PLAPP, Jr. (1982). Biochemical genetics of resistance to aryl carbamate insecticides in the predaceous mite, *Metaseiu occidentalis*. **J. Econ. Entomol.**, **75**, 304-307.
- 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.
- SAMBROOK, J., FRITZ, E.F. Y MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANCHIS, V., D. LERECLUS, G. MENOUE, J. CHAUFAX Y M.-M LECADET (1988). Multiplicity of  $\delta$ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Mol. Microbiol.**, **2**, 393-404.
- SANCHIS, V., D. LERECLUS, G. MENOUE, J. CHAUFAX, S. GUO Y M.-M LECADET (1989). Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera* active delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Mol. Microbiol.**, **3**, 229-238.
- SANCHIS, V. Y D.J. ELLAR (1993). Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin binding proteins from *Spodoptera littoralis* gut membranes. **FEBS Lett.** **316**, 246-268.
- SANGADALA, S., F.S. WALTERS, L.H. ENGLISH Y M.J. ADANG (1994). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin binding and <sup>86</sup>Rb-K<sup>+</sup> efflux *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, **269**(13), 10088-10092.
- SEBESTA, K., FARKAS, J. Y HORSKA, K. (1981). Thuringiensin, the  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In **Microbial Control of Pests and Diseases 1970-1980** (de. H.D. Burgess), pp. 249-281. Academic Press

- SEKAR, V., THOMPSON, D.V., MARONEY, M.J., BOOKLAND, R.G. Y ADANG, M.J. (1987). Molecular cloning and characterisation of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis*
- SCHNEPF, H.E. Y H.R. WHITTELEY (1985). Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **J. Biol. Chem**, **260**, 6273-6276.
- SCHNEPF, H.E., N. CRICKMORE, J. VAN RIE, D. LERECLUS, J. BAUM, J. FEITELSON, D. ZEIGLER Y D. DEAN (1996). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. En preparación.
- SHELTON, A.M. Y J.A. WYMAN (1990). Insecticide resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in North America. **Abstracts of the International Diamondback Workshop**. Taina, Taiwan.
- SHELTON, A.M., J.L. ROBERTSON J.D. TANG, C. PÉREZ, S.D. EIGENBRODE, H.K. PREISLER, W.T. WILSEY Y R.J. COOLEY (1993). Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. **J. Econ. Entomol.**, **86**,697-705.
- SICK, A., GAERTNER, F. Y WONG, A. (1990). Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. **Nucleic Acids Research** **18**, 1305.
- SIDEN. I., DALHMMAR, TELANDER, B., BOMAN, H. G. Y SOMERVILLE, H., (1979). Virulence factors in *Bacillus thuringiensis*: purification and properties of a protein inhibitor of immunity in insects. **Journal of General Microbiol.**, **114**, 45-52.

- 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.
- SMITH, G.P. Y D.J. ELLAR (1994). Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin affects insecticidal specificity. **Biochem. J.** **302**, 611-616.
- STALIN, 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.
- 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.
- 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. CRS Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- SWARTZ, N.M. (1963). Nature of ethyl methanesulfonate induced reversions of lac<sup>-</sup> mutants of *Escherichia coli*. **Genetics**, **48**, 1357-1375.
- TABASHNIK, B.E., N.L. CUSHING Y M.W. JOHNSON (1987). Diamondback Moth (Lepidoptera: plutellidae) resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation and cross-resistance. **J. Econ. Entomol.**, **80**, 1091-1099.
- TABASHNIK, B.E., N.L. CUSHING, N. FINSON Y M.W. JOHNSON (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). **J. Econ. Entomol.**, **83**, 1671-1676.



- TABASHNIK, B.E., J.M. SCHWARTZ, N. FINSON Y M.W. JOHNSON (1992a). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.** **85**, 1046-1055.
- TABASHNIK, B.E., (1992b). Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) and potato colorado beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.** **85(5)**, 1551-1559.
- TABASHNIK, B.E., N. FINSON, M.W. JOHNSON, Y W.J.MOAR (1993). Resistance to toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki causes minimal cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). **Appl. Environ. Microbiol.**, **59(5)**, 1332-1335.
- TABASHNIK, B.E., N. FINSON, F.R. GROETERS, W.J.MOAR, M.W. JOHNSON, K. LUO Y M.J. ADANG (1994a). Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, **91**, 4120-4124.
- TABASHNIK, B.E., N. FINSON, M.W. JOHNSON, Y D.G. HECKEL (1994b). Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). **Appl. Environ. Microbiol.**, **60(12)**, 4627-4629.
- TABASHNIK, B.E.(1994c). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu.Rev. Entomol.** **39**, 47-79.
- TABASHNIK, B.E., N. FINSON, M.W. JOHNSON, Y D.G. HECKEL (1995). Prolonged selection affects stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). **J. Econ. Entomol.**, **88**, 219-224.
- TABASHNIK, B.E., T. MALVAR, Y-B. LIU, N. FINSON, D. BORTHAKUR, B.S. SHIN, S-H. PARK, L. MASSON, R.A. DE MAAGD Y D. BOSCH (1996). Cross-resistance of the Diamondback moth indicates altered interactions with domain

II of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62(8)**, 2839-2844.

TABASHNIK, B.E., (1997). PNSA

TAILOR, R., TIPPETT, J., GIBB, G. PELLIS, S., PIKE, D., JORDAN, L. Y ELY, S. (1992). Identification and characterisation of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molec. Microbiol.** **6**, 1211-1217.

TANG, J.D., A.M. SHELTON, J.VAN RIE, S DE ROECK, W.J., MOAR, R.T. ROUSH, Y M. PEFEROEN (1996). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**, 564-569.

THOMAS, W.E. Y D.J. ELLAR, (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal  $\delta$ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **J. Cell. Sci.**, **60**, 181-197.

THOMPSON, M.A., H.E. SCHNEPF Y J.S. FEITELSON (1995). Structure, function and engineering of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Genetic Engineering**, vol. **17**. Plenum Press, N.Y.

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.

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.

- VADLAMUDI, R.K., E. WEBER, I. JI, T.H. JI Y L.A. BULLA JR. (1995). Cloning and expression of a receptor for insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. . **J. Biol. Chem.**, **270**(10), 5490-5494.
- VAEK, M., A. REYNAERTS, H. HÖFTE, S. JANSSENS, M. DE BEUCKELEER, C. DEAN, M. ZABEAU, M. VAN MONTAGU Y J. LEEMANS. (1987). Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, **327**, 33-37.
- 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 Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, **25**(10), 1143-1151.
- VAN FRANKENHUYZEN, K., J.L. GRINGORTEN, R.E. MILNE, D. GAUTHIER, M. PUSZTAI, B. BROSSEAU Y L. MASSON (1991). Specificity of activated Cry1a proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 for defoliating forest lepidoptera. **Appl. Env. Microbiol.**, **57**(6), 1650-1655.
- VAN RIE, J. W.H. McGAUGHEY, D.E. JOHNSON, B.D. BARNETT Y H. VAN MELLAERT (1990a). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, **247**, 72-74.
- VAN RIE, S. JANSSENS, H. HÖFTE, D. DEGHEELE Y H. VAN MELLAERT (1990b). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Appl. Env. Microbiol.**, **56**, 1378-1385.
- VAN RIE, S. JANSSENS, 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.

- VISSER, B., T. VAN DER SALM, W. VAN DER BRINK Y G. FOLKERS (1988). Genes from *Bacillus thuringiensis* entomocidus 60.5 coding for insect-specific crystal proteins. **Mol. Gen. Genet.**, **212**, 219-224.
- WARD, E.S. Y D.J. ELLAR (1983). Assignment of the d-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. **FEBS Letters**, **158**, 45-49.
- WARD, E.S., A.R. RIDLEY, D.J. ELLAR Y J.A. TODD (1986). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin: cloning and expression of the toxin in sporogenic and asporogenic strains of *Bacillus subtilis*. **J. Mol. Biol.**, **191**, 13-22.
- 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.
- WILLIAMSON, M.S., Y. DENHOLM, C.A. BELL Y A.L. DEVONSHIRE (1993). Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). **Mol. Gen. Genet.**, **240**, 17-22.
- WIDNER, W.R. Y WHITELEY, H.R. (1989). Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. **Journal of Bacteriol.**, **171**, 965-974.
- WIDNER, W.R. Y WHITELEY, H.R. (1990). Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriol.**, **172**, 2826-2832.
- WILLIAMSON, M.S., Y. DENHOLM, C.A. BELL Y A.L. DEVONSHIRE (1993). Knockdown resistance (kdr) to Ddt and pyrethroid insecticides maps to a

- sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). **Mol. Gen. Geneet.**, **240**, 17-22.
- 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.
- 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.
- WRIGHT, D., M. IQBAL, F. GRANERO Y J. FERRÉ (1997). A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Appl. Env. Microbiol.**, **63**(5)
- WU, D. Y A.I. ARONSON (1990). Use of mutagenic oligonucleotides for defining regions of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity. **Proc. 5th Int. Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control**. Adelaide, Australia. pp. 273-277.
- WU, D. Y F.N. CHANG (1985). Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. **FEBS Lett.**, **190**(2), 232-236.
- WU, S.J. Y D.H. DEAN (1996). Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* Cry3A  $\delta$ -endotoxin. **J. Mol. Biol.** **255**, 628-640.

- YAMAMOTO, T. Y G.K. POWELL (1993). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: recent advances in understanding its insecticidal activity. **In Advanced Engin. Pest.** (de L. Kim), pp. 3-42. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- YU, Y.-M., M. OHBA Y S.S GILL (1991). Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1075-1081.
- YU, S.J. Y S.N. NGUYEN (1994). Inheritance of carbaryl resistance and microsomal oxidases in the fall armworm (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Econ. Entomol.**, 87(2), 301-304

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de  
D<sup>ña</sup> VICTORIA BALLESTEN MARTINEZ  
la calificación de APTO. CON LAURE POR UNANIMIDAD  
Valencia, a 29 de JULIO de 1997

El Secretario,

El Presidente

