

# ***Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas**

DIEGO H. SAUKA\*, GRACIELA B. BENINTEDE

*Área Bioinsumos Microbianos, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), De los Reseros y Las Cabañas s/nro. C.C. 25 (1712) Castelar, Buenos Aires, Argentina*

\* Correspondencia. E-mail: dsauka@cnia.inta.gov.ar

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* es el insecticida biológico más aplicado en el mundo y se utiliza para controlar diversos insectos que afectan la agricultura, la actividad forestal y que transmiten patógenos humanos y animales. *B. thuringiensis* constituyó durante las últimas décadas un tema de investigación intensiva. Estos esfuerzos brindaron datos importantes sobre las relaciones entre la estructura, el mecanismo de acción y la genética de sus proteínas cristalinas pesticidas, y una visión más clara y coherente sobre estas relaciones ha emergido gracias a ellos. Otros estudios se centraron en el rol ecológico de las proteínas cristalinas de *B. thuringiensis*, su funcionamiento en sistemas agrícolas y en otros sistemas naturales. Teniendo como base todo el conocimiento generado y las herramientas de la biotecnología, los investigadores están ahora divulgando resultados prometedores sobre el desarrollo de toxinas más útiles, bacterias recombinantes, formulaciones nuevas y plantas transgénicas que expresan actividad pesticida, con el objetivo de asegurar que estos productos sean utilizados con un mayor beneficio y eficacia. Este artículo constituye una tentativa de integrar todos estos progresos recientes sobre el estudio de *B. thuringiensis* en un contexto de control biológico de plagas de insectos lepidópteros de importancia agrícola.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, bioinsecticida, insectos lepidópteros

## ABSTRACT

***Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pests.** *Bacillus thuringiensis* is the most widely applied biological pesticide used to control insects that affect agriculture and forestry and which transmit human and animal pathogens. During the past decades *B. thuringiensis* has been the subject of intensive research. These efforts have yielded considerable data about the relationships between the structure, mechanism of action, and genetics of their pesticidal crystal proteins. As a result, a coherent picture of these relationships has emerged. Other studies have focused on the ecological role of the *B. thuringiensis* crystal proteins and their performance in agricultural and other natural settings. With this knowledge as background and the help of biotechnological tools, researchers are now reporting promising results in the development of more useful toxins, recombinant bacteria, new formulations and transgenic plants that express pesticidal activity, in order to assure that these products are utilized with the best efficiency and benefit. This article is an attempt to integrate all these recent developments in the study of *B. thuringiensis* into a context of biological control of lepidopteran insect pest of agricultural importance.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, bioinsecticide, lepidopteran insect pest

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, alternativas a los insecticidas químicos. Esto estimula considerablemente el interés en usar patógenos como agentes de biocontrol. El patógeno más exitoso en cumplir este objetivo, que además mantiene potencial para seguir desarrollándose, es la bacteria con cualidades insecticidas *Bacillus thuringiensis*. Esta posee una toxicidad selectiva alta debido a su estrecho rango de

especificidad y gracias a ello genera en el ambiente un impacto muy bajo.

Esta actualización es un intento de integrar los desarrollos recientes de la biología y la genética molecular en el estudio de esta bacteria entomopatógena dentro de un contexto de control biológico de insectos lepidópteros que son plagas de cultivos de interés agrónomico.

Algunas revisiones generales sobre este tema fueron publicadas hace un tiempo atrás en idioma inglés y sobre ellas basaremos parte de nuestra discusión (20, 107). Sin embargo, creemos necesario retomar el tema tenien-

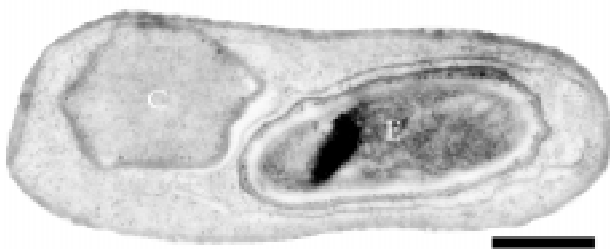
do en cuenta resultados recientes y nuestras propias observaciones.

## CARACTERÍSTICAS GENERALES

*Bacillus thuringiensis* es un bacilo gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (Figura 1) (49). Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y con actividad de catalasa (117). Los distintos aislamientos de *B. thuringiensis* presentan en general características bioquímicas comunes. Poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina. Sin embargo, la característica principal de *B. thuringiensis* es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (Figura 1) (107). Estas proteínas se llaman Cry (del inglés, **C**ry**s**tal) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial.

## SITUACIÓN TAXONÓMICA Y CLASIFICACIÓN

*B. thuringiensis* pertenece a la familia *Bacillaceae* y se ubica dentro del grupo 1 del género *Bacillus*; forma parte del grupo de *Bacillus cereus*, el que incluye a *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, así como también a los más recientemente descritos *B. pseudomycooides* (93) y *B. weihenstephanensis* (77). Se encuentra estrechamente relacionado con los dos primeros, de los que no logra distinguirse por completo debido a que no existen suficientes diferencias en sus características morfológicas y bioquímicas, por lo que la designación de *B. thuringiensis* como especie ha estado sometida a discusión (107). A pesar de esto, el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* reconoce la individualidad de estas especies basándose sobre todo en dos características



**Figura 1.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de *B. thuringiensis* en estado de esporangio. C: cristal parasporal; E: espora. Barra, 0,5  $\mu\text{m}$ .

diferenciales: la presencia de la inclusión o cristal parasporal y sus propiedades insecticidas (117).

*B. thuringiensis* se clasifica en 84 serovares mediante serología del antígeno flagelar H (Tabla 1). Se trató de establecer relaciones entre estos serovares y su actividad insecticida o la presencia de algún tipo de cristal en particular pero no se tuvo éxito, por lo que su significado biológico no está claro. Por ejemplo, el serovar *morrisoni* agrupa cepas que son tóxicas para lepidópteros, dípteros y coleópteros; no todas las cepas de *B. thuringiensis* svar *aizawai* son tóxicas para *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera). Existen, además, cepas de *B. thuringiensis* que no pueden clasificarse utilizando esta metodología, ya que no pueden formar flagelos. Todas estas cepas se agruparon en un serovar, actualmente desaparecido de la literatura (76).

## CRISTALES PARASPORALES

Desde el instante en el que ocurre el englobamiento de la pre-espora hasta su maduración, en simultaneidad con la formación de la espora, tiene lugar en *B. thuringiensis* la síntesis de uno o varios cristales parasporales, que pueden representar hasta un 30% del peso seco del esporangio (18). Estos cristales pueden presentar distintas morfologías y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (69).

Se logró en muchos casos establecer asociaciones entre la morfología del cristal, sus proteínas Cry constituyentes, el peso molecular de éstas y su espectro de actividad insecticida (Tabla 2) (83). Sin embargo, existen trabajos en los que se describieron cristales parasporales que, a pesar de tener morfologías asociadas a una toxicidad específica, no parecen poseer actividad insecticida alguna (6, 83).

Los cristales de *B. thuringiensis* pueden ser degradados por la acción de los microorganismos del suelo (134) y, al igual que sus esporas, también pueden ser inactivados por la acción de la luz ultravioleta (81, 97).

El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora, y ambos son finalmente liberados tras la lisis celular. Existen algunos casos donde se describieron cristales dentro del exosporio, por lo que estos continúan junto a las esporas tras la lisis (61, 83). En otro caso muy atípico, se pudo observar que los cristales se forman fuera del exosporio, pero ambos permanecen indefinidamente dentro de un esporangio que no se lisa, preservándolos de una rápida degradación (Figura 2) (104).

Cada cuerpo de inclusión cristalino puede estar constituido por proteínas Cry de una o varias clases (62, 87) que se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro (73). La estabilidad de estas uniones condiciona el pH de solubilización del cristal (ver "Mecanismo de acción"). Particularmente en el caso de los cristales bipiramidales,

**Tabla 1.** Clasificación de *B. thuringiensis* de acuerdo con el antígeno H.

Antígeno H	Serovar	Antígeno H	Serovar	Antígeno H	Serovar
1	<i>thuringiensis</i>	19	<i>tochigiensis</i>	44	<i>higo</i>
2	<i>finitimus</i>	20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	45	<i>roskildiensis</i>
3a, 3c	<i>alesti</i>	20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	46	<i>chanpasis</i>
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	21	<i>colmeri</i>	47	<i>wratislaviensis</i>
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	22	<i>shandongensis</i>	48	<i>balearica</i>
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	23	<i>japonensis</i>	49	<i>muju</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	50	<i>navarrens</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	51	<i>xiaguangensis</i>
5a, 5b	<i>galleriae</i>	25	<i>coreanensis</i>	52	<i>kim</i>
5a, 5c	<i>canadensis</i>	26	<i>silo</i>	53	<i>asturiensis</i>
6	<i>entomocidus</i>	27	<i>mexicanensis</i>	54	<i>poloniensis</i>
7	<i>aizawai</i>	28a, 28b	<i>monterrey</i>	55	<i>palmanyolensis</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	28a, 28c	<i>jegathesan</i>	56	<i>rongseni</i>
8a, 8c	<i>ostrinae</i>	29	<i>amagiensis</i>	57	<i>pirenaica</i>
8a, 8d	<i>nigeriensis</i>	30	<i>medellin</i>	58	<i>argentinensis</i>
9	<i>tolworthi</i>	31	<i>toguchini</i>	59	<i>iberica</i>
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	32	<i>cameroun</i>	60	<i>pingluonsis</i>
10a, 10c	<i>londrina</i>	33	<i>leesis</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	34	<i>konkukian</i>	62	<i>zhaodongensis</i>
11a, 11c	<i>kyushuesis</i>	35	<i>seoulensis</i>	63	<i>bolivia</i>
12	<i>thompsoni</i>	36	<i>malaysiensis</i>	64	<i>azorensis</i>
13	<i>pakistani</i>	37	<i>andaluciensis</i>	65	<i>pulsiensis</i>
14	<i>israelensis</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>	66	<i>graciosensis</i>
15	<i>dakota</i>	39	<i>brasiliensis</i>	67	<i>vazensis</i>
16	<i>indiana</i>	40	<i>huazhongensis</i>	68	<i>thailandensis</i>
17	<i>tohokuensis</i>	41	<i>sooncheon</i>	69	<i>pahangi</i>
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	42	<i>jinhongensis</i>	70	<i>sinensis</i>
18a, 18c	<i>yosoo</i>	43	<i>guiyangensis</i>	71	<i>jordanica</i>

**Tabla 2.** Asociaciones entre los principales tipos de cristales de *B. thuringiensis*, proteínas Cry y su espectro de actividad insecticida.

Tipo de cristal	Grupo	Peso molecular (kDa)	Toxicidad
Bipiramidal	Cry1	130	Lepidópteros
Cúbico	Cry2	65	Lepidópteros y Dípteros
Cuadrado aplanado	Cry3	72	Coleópteros
Esférico	Cry4A, Cry4B, Cry10 y Cry11	135, 128, 78, 72	Dípteros

cuando estos puentes están distorsionados, estos cristales son solubles a pH mayor de 9,5; mientras que si permanecen en su estado más estable necesitan un pH superior a 12 para lograrlo (84).

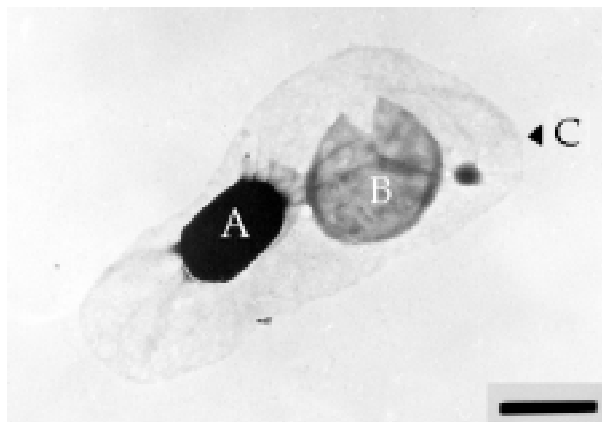
### MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describió principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del

insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño *per se*, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva (14). Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial (14, 50). Luego, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, se inicia una cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la

muerte celular (138). Además, el inicio de esa cascada de señalización estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula y aumenta el número de receptores; por ende, recluta un número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial (139). Por otro lado, con base en experimentos *in vitro* y bioensayos, se propone que la unión de los monómeros a caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo *N*-terminal de la toxina (46, 64). Este último clivaje induce el ensamble de los monómeros y se establece una forma oligomérica pre-poro. Esta estruc-

tura incrementa la afinidad por un receptor secundario como puede ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina (14, 67). Por último, la unión a ese segundo receptor facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio, esto provoca un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular (Figura 3) (14). El tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y lleva a la muerte del insecto. La muerte puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele del insecto (32, 107). Broderick *et al.* (16) descartaron estas posibilidades y demostraron que la mortalidad inducida por *B. thuringiensis* dependería en esencia de ciertas bacterias entéricas que son parte de la microbiota normal del intestino del insecto susceptible, ya que sólo *B. thuringiensis* no sería suficiente. Estas bacterias serían responsables de causar la septicemia en el insecto luego de que *B. thuringiensis* les permite alcanzar el hemocele tras dañar el epitelio intestinal.

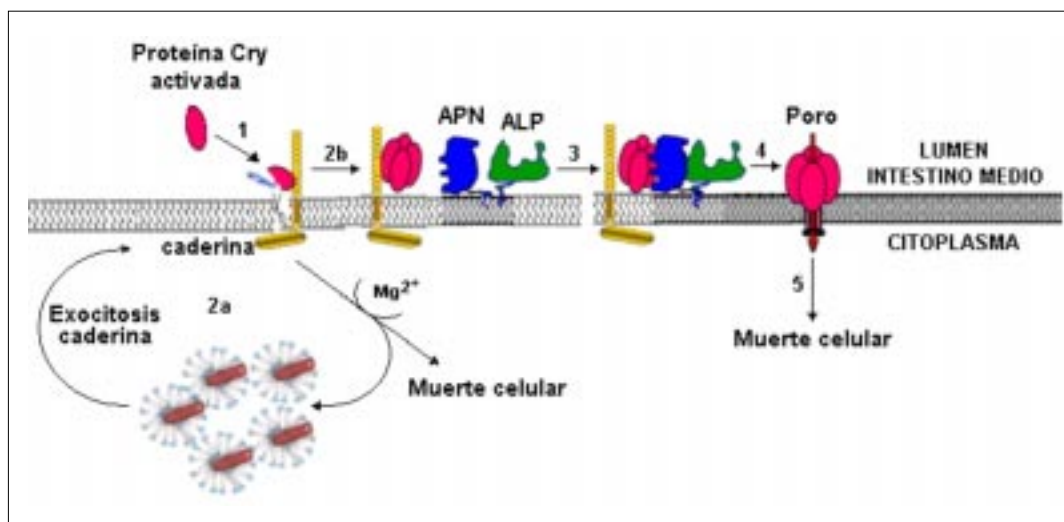


**Figura 2.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa atípica de *B. thuringiensis* que permanece ininterrumpidamente en forma de esporangio. A: espora; B: cristal ovoide; C: borde del esporangio que no se lisa. Sauka y Benintende (104). Barra, 1  $\mu$ m.

### GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS INSECTICIDAS Cry

Existen 376 genes *cry* distintos que se clasificaron sobre la base de su similitud de secuencias en 54 grupos divididos en diferentes clases y subclases (25, 26). Una lista actualizada de todos estos genes *cry*, cuyo número aumenta día a día, se encuentra disponible con acceso libre en Internet (26).

Los genes *cry* poseen una secuencia codificante de entre 1900 pares de bases (pb) (*cry2Ab*) y unos 3600 pb



**Figura 3.** Mecanismo de acción de proteínas Cry en insectos lepidópteros. 1) Unión de la toxina a caderina y clivaje desde su extremo C-terminal para generar la forma monomérica activa; 2a) inicio de la cascada de señalización dependiente de  $Mg^{2+}$ , estimulación de exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical y consiguiente muerte celular; 2b) formación de la estructura oligomérica pre-poro; 3) unión del oligómero a la aminopeptidasa N (APN) y/o fosfatasa alcalina (ALP) y migración a zonas específicas de la membrana; 4) formación del poro; 5) desequilibrio osmótico y consiguiente muerte celular. Adaptado de Bravo *et al.* (15) y Zhang *et al.* (138).

(*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, etc.) (25). Las proteínas que codifican presentan una identidad aminoacídica que puede variar desde más de un 90% hasta menos de un 20%, y el intervalo de masas moleculares oscila entre 50 y 140 kDa. Más adelante se discutirá en detalle sobre las características generales y específicas de estas proteínas.

Las cepas de *B. thuringiensis* pueden portar un único gen *cry*, como por ejemplo *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-73, que posee solamente un gen *cry1Ac* (48), o bien presentar perfiles génicos muy complejos, con hasta ocho genes *cry* diferentes (2, 7, 15, 65, 100, 125, 129).

En general, es posible correlacionar el tipo de gen *cry* presente en una determinada cepa o aislamiento con su actividad insecticida. Por lo tanto, la identificación del contenido génico *cry* de una cepa de *B. thuringiensis* puede utilizarse para efectuar dicha predicción (96).

Existe la idea generalizada de que los genes *cry* siempre se localizan en plásmidos de peso molecular elevado que se replican mediante un mecanismo específico conocido como de tipo "theta" (5). A pesar de esto, un reporte reciente informa la detección de un gen *cry* en un plásmido de bajo peso molecular que se replica mediante un mecanismo de círculo rodante (82). También se informó la existencia de genes *cry* insertados en el cromosoma de *B. thuringiensis* (71, 72, 101).

### Genes *cry* que codifican proteínas tóxicas para insectos lepidópteros

#### *Genes cry1*

Los genes *cry1* codifican proteínas de aproximadamente 130 kDa que se agrupan durante la esporulación en inclusiones cristalinas bipiramidales. Como ya fue mencionado, estas proteínas son sintetizadas como protoxinas que se solubilizan en las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto y se activan por proteólisis en toxinas —en este caso de aproximadamente 65 kDa— mediante proteasas asociadas al cristal o al intestino medio de la larva. Esta activación proteolítica puede ser llevada a cabo *in vitro* utilizando una gran variedad de proteasas (135).

La gran mayoría de los genes *cry* que se conocen pertenecen al grupo *cry1*, y estos son sin duda los más estudiados. Se han informado hasta hoy 150 genes *cry1* distintos, los que han sido clasificados en 12 clases (A a L) (26). Estos genes fueron los primeros en ser caracterizados (109), así como también en ser modificados genéticamente (92). Hace poco, nuestro grupo publicó una estrategia nueva para la amplificación y secuenciación de genes *cry1A* en forma completa; en esa comunicación se detalla una lista de cebadores que fueron diseñados para tal fin (103). Se lograron identificar dos genes *cry1A* a partir de un aislamiento nativo de *B. thuringiensis* como fruto de este trabajo, que fueron aceptados por el Bt Pesticidal Crystal Protein Nomenclature Committee como variantes naturales nuevas (26, 103).

La frecuencia de detección de los distintos genes *cry1* varía en forma marcada. Algunos genes, como los *cry1A*, se detectan con más frecuencia que otros —de hecho, se han presentado en más de la mitad de las cepas analizadas—; mientras que otros como los *cry1H*, *cry1K* o los *cry1L* son muy raros. Luego de los de la clase *cry1A*, los genes más comunes de encontrar son los de las clases *cry1C* y *cry1D*. En cambio, los genes *cry1B*, *cry1E*, *cry1F* y *cry1G* se detectan con una frecuencia menor, a pesar de existir excepciones (7, 15, 22, 125). Un ejemplo de ello es la importante presencia de genes *cry1E* en una colección china de *B. thuringiensis* (59). También se encontró una presencia elevada (30% de los aislamientos), pero de genes *cry1B*, en otro estudio de tamizaje (23). Los genes *cry1I* son otra clase bastante común de hallar. Mediante diversas técnicas de biología molecular se confirmó la amplia distribución de estos genes en cepas de *B. thuringiensis* (106, 113). Esta clase de genes *cry1* presenta una serie de características distintivas con respecto al resto de los miembros de este grupo. Se sugirió la naturaleza críptica de estos genes, ya que a sus proteínas no se las encontró formando parte de los cristales parasporales (43, 120). Los genes *cry1I* están localizados generalmente 500 pb "corriente abajo" de los genes *cry1A*, y se cree que no se expresan debido a la ausencia de una región promotora (113, 120). Otro grupo comunicó que estos genes se expresan y secretan en una fase temprana de la esporulación (74). El clonado y la expresión de esta clase de genes en *Escherichia coli* reveló que codifican proteínas de 81 kDa, sólo tóxicas para larvas de lepidópteros (29, 43, 113). Sin embargo, Tailor *et al.* ya habían informado con anterioridad (120) que estas poseían una toxicidad dual para larvas de lepidópteros y coleópteros. En la actualidad existen otros trabajos que verifican esa actividad insecticida dual (52, 86, 99), por lo que serían necesarios más estudios para dilucidar esta cuestión.

En estudios de distribución de genes *cry* se reveló la existencia de distintas asociaciones que involucran genes *cry1* en una misma cepa de *B. thuringiensis*. Es muy común que se encuentren genes *cry1I* cuando otro gen *cry1* está presente, y esto sería consistente con la ubicación física de los genes *cry1I* en el genoma de *B. thuringiensis* próximos a otros genes *cry1* (129). Recientemente se halló que esta asociación tan fuerte entre ambas clases de genes *cry1* se debe sobre todo a la relación entre los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y/o *cry1Ac* con *cry1Ia* en especial (102). Otra combinación frecuente de encontrar es la de los genes *cry1C* y *cry1D* (15, 28, 125, 129). La asociación entre estos dos genes puede ser explicada por su ubicación en el mismo replicón en una cepa de *B. thuringiensis* svar. *aizawai*, en la que ambos genes están separados por tan sólo 3 kb (101). Sin embargo, la combinación más frecuentemente detectada es la de genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*, ya sea los tres juntos o de a pares (7, 15, 22, 56, 65, 70, 102, 125). Estos tres

genes *cry1* forman parte de *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1; *cry1Aa* y *cry1Ac* se localizan juntos en un plásmido de 110 MDa y *cry1Ab* dentro de otro más pequeño e inestable de 44 MDa (21).

#### Genes *cry2*

Los genes del grupo *cry2* poseen marcos de lectura abiertos (*orf*; del inglés, open reading frames) de unas 1900 pb, ya que carecen del gran fragmento C-terminal presente en otros genes *cry*. Estos codifican proteínas de 65 kDa que se agrupan en inclusiones cuboidales. Los genes *cry2* están presentes en cepas de distintos serovares: *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* svar. *thuringiensis* Berliner, *B. thuringiensis* svar. *kenyae*, *B. thuringiensis* svar. *tolworthi*, etc. Las proteínas codificadas por estos genes fueron previamente designadas como proteínas P2, en oposición a las inclusiones cristalinas P1 de 130 kDa presentes en las mismas cepas (58). Existen descritos en la actualidad 43 genes *cry2* distintos clasificados en sólo una clase (A) (26).

Los genes *cry2Aa* tendrían la peculiaridad de estar ubicados en la región más distal de un operón del cual formarían parte. Este consistiría de tres marcos abiertos de lectura (*orf1*, *orf2* y *cry2Aa*) (58). La proteína Cry2Aa requiere de la proteína que corresponde al segundo gen de este operón (*Orf2*) para la formación del cristal. Esta última se encontraría ausente en el cristal, a pesar de ser indispensable para su formación (24). Por otro lado, no está claro si los productos del *orf1* y de *cry2Ab* estarían presentes en el cristal. Los cristales de algunas de las cepas que contienen *cry2Ab* presentan poca o nada de la correspondiente proteína (30, 87). Si se inserta a este gen tras un promotor fuerte se alcanza un nivel elevado de expresión, lo que indicaría que la expresión deficiente de *cry2Ab* es resultado de un promotor débil.

Los genes *cry2* también se encuentran de manera frecuente en *B. thuringiensis* (105), sobre todo entre aquellas cepas que poseen genes *cry1* (7, 102, 125). Es muy común que se encuentren los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* simultáneamente o el gen *cry2Ab* solo, pero no el *cry2Aa* en forma aislada (7, 105). Sólo existe un trabajo donde se describió el hallazgo atípico de un aislamiento de *B. thuringiensis* con sólo el gen *cry2Aa* (105).

#### Genes *cry9*

Los genes *cry9* son de los menos estudiados entre aquellos que codifican proteínas tóxicas para lepidópteros. No obstante, son considerados herramientas muy promisorias para el control eficiente y el manejo de la resistencia de muchas especies de lepidópteros que son importantes desde el punto de vista agronómico (63, 90, 127). Existen actualmente 15 genes *cry9* distintos clasificados en 5 clases (A, B, C, D y E) (26), que codifican para protoxinas de 130 kDa. Estas proteínas producidas por los genes de las clases *cry9A*, *cry9B*, *cry9C* y *cry9E*

se agruparían en inclusiones cristalinas bipiramidales. Por otra parte, los genes *cry9D* lo harían dentro de inclusiones esféricas que no presentarían ninguna relación con las inclusiones bipiramidales y cuboidales típicas de cepas de *B. thuringiensis* tóxicas para lepidópteros (132, 133). La subclase *cry9Aa* (antes denominada *crylg*) fue el primer gen de este grupo en ser descubierto a partir de una cepa de *B. thuringiensis* svar. *galleriae* (116). Posteriormente, el gen críptico *cry9Ba* (antes denominado *cryX*) se informó "corriente arriba" de *cry9Aa* (112). La falta de un codón de iniciación en su secuencia nucleotídica le brindaría su naturaleza críptica, por lo cual no podría expresarse *in vivo* (112).

Si bien se sabe que los genes *cry1* y *cry2* tienden a hallarse juntos en *B. thuringiensis*, no existiría una asociación clara entre ellos y los genes *cry9* (102).

#### Genes *cry15*

Este grupo está formado por sólo un integrante que es el gen *cry15Aa* (26). Este gen codifica para una protoxina de aproximadamente 40 kDa que se agrupa en una inclusión cristalina cuboidal, la cual resulta tóxica para *Manduca sexta* (17). Es muy poca la información disponible acerca de este grupo. Parecería ser que su presencia se restringe sólo a cepas de *B. thuringiensis* svar. *thompsoni* (17, 35).

## OTROS FACTORES DE VIRULENCIA PRODUCIDOS POR *B. THURINGIENSIS*

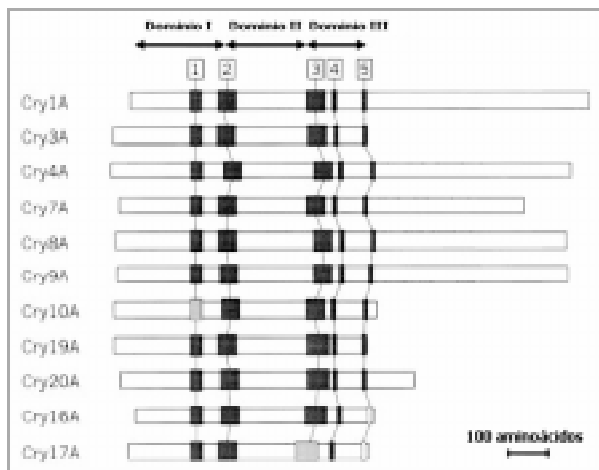
Además de las proteínas Cry, *B. thuringiensis* posee otros factores de virulencia que le permitirían sobrevivir y multiplicarse dentro del huésped, evadir su sistema inmune y producir septicemia. Algunos de estos factores de virulencia, como fosfolipasas (111), enterotoxinas (111),  $\beta$ -exotoxinas (37), y quitinasas (3, 4, 122), no tienen especificidad por el orden de insectos que afectan y se encuentran ampliamente distribuidos dentro de los distintos serovares de *B. thuringiensis* y otros miembros del grupo *B. cereus* (55). Por otro lado, algunos *B. thuringiensis* poseen otros factores de virulencia que sí tienen especificidad por el orden de insectos que afectan. Tal es el caso de las proteínas Cyt que se encuentran formando parte principalmente de los cristales de cepas mosquitocidas de *B. thuringiensis* (ej. svar. *israelensis*, *kyushuensis*, *darmstadiensis*, *medellin*, etc.), aunque también se pueden llegar a encontrar rara vez en alguna cepa tóxica para lepidópteros (ej. svar. *morrisoni* HD-12) (53, 54, 66). Estas proteínas son hemolíticas y citolíticas *in vitro* y son especialmente tóxicas para larvas de dípteros *in vivo* (54). Otro caso de factores de virulencia que tienen especificidad por el orden de insectos que afecta lo constituye el grupo de proteínas llamado Vip (*vegetative insecticidal proteins*). Las Vip son proteínas insecticidas no relacionadas con las Cry que no forman inclusiones cristalinas y que se

secretan al medio durante el crecimiento vegetativo de la bacteria (36). Incluyen la toxina binaria Vip1 y Vip2 con especificidad para coleópteros y la toxina Vip3 con especificidad para lepidópteros (36, 130, 131). Existen en la actualidad 40 genes *vip3* distintos clasificados en 2 clases (A y B), que codifican para proteínas de aproximadamente 88 kDa (26, 36). Si bien las Vip3 compartirían algunas etapas en el modo de acción con las Cry, utilizarían distintos receptores (78). Otras proteínas llamadas Sip (*secreted insecticidal proteins*) fueron recientemente descritas, pero muy poco se conoce de ellas (34). Sólo se conoce un miembro de este grupo: la proteína Sip1A, que también es producida y secretada por *B. thuringiensis* durante su etapa de crecimiento vegetativo y que posee propiedades insecticidas para coleópteros (34).

## ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS Cry

Las estructuras tridimensionales de las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac (tóxicas para lepidópteros), Cry3Aa y Cry3Bb (tóxicas para coleópteros), Cry2Aa (toxicidad dual para lepidópteros y dípteros), y Cry4Aa y Cry4Ba (tóxicas para dípteros) fueron dilucidadas a través de cristalografía de rayos X (9, 10, 31, 39, 51, 79, 80, 91). Las estructuras de estas proteínas muestran, a pesar de poseer distinto espectro de acción, una topología común compuesta por 3 dominios. En general, el dominio I de estas proteínas Cry está formado por 7 estructuras  $\alpha$ -hélice, donde una hélice central está rodeada por las otras 6. Este dominio participaría en la formación del poro en la membrana de las células intestinales del insecto susceptible (ver "Mecanismo de acción") (79, 95, 110). El dominio II está formado por 3 láminas de estructura  $\beta$  en antiparalelo y participaría en la interacción con el receptor, por lo que sería determinante en la especificidad (41, 45, 57, 79, 98, 108, 114). El dominio III es un  $\beta$ -sandwich en antiparalelo que parecería ser importante para la estabilidad de la toxina (79, 88), como así también para su especificidad (19, 33, 45, 57, 80) y en la modulación de la actividad de canales iónicos en el intestino medio de los insectos susceptibles (27, 137).

La estructura primaria de las proteínas Cry presenta en general 5 bloques conservados que originalmente fueron descritos por Höfte y Whiteley (58) entre las proteínas Cry conocidas por entonces. Estas observaciones fueron más tarde confirmadas por Schnepf *et al.* (107) en la gran mayoría de las proteínas Cry (Figura 4). Estos 5 bloques conservados están localizados en regiones importantes dentro de la estructura tridimensional, ya que corresponden a regiones internas de los dominios o límites entre ellos. El bloque 1 está constituido por la  $\alpha$ -hélice central del dominio I; el límite entre los dominios I y II constituye el bloque 2; el bloque 3 abarca la última lámina  $\beta$  del dominio II y la primera del III. Los bloques 4 y 5 corresponden a las láminas  $\beta$  centrales del dominio



**Figura 4.** Posiciones de los distintos bloques conservados entre las proteínas Cry. Los bloques conservados se representan en color negro, mientras que aquellos de color gris indican una similitud un poco más baja con respecto a la secuencia consenso. Adaptado de Schnepf *et al.* (107).

III (51, 79). La localización estratégica de estas regiones sugiere que por lo menos las proteínas Cry de *B. thuringiensis* que las contienen pueden tener un plegamiento similar y, por lo tanto, un mecanismo de acción semejante.

## Proteínas Cry y Vip tóxicas para insectos lepidópteros

Las proteínas de la clase Cry1 y las Vip3 son las consideradas tradicionalmente tóxicas para las larvas del orden *Lepidoptera*. Las diferencias aminoacídicas que presentan se traducen comúnmente en variaciones de toxicidad y especificidad (8, 124). En general, las proteínas Cry y Vip muestran espectros de actividad reducidos y muchas veces acotados a unas cuantas especies de insectos pertenecientes a un mismo orden. No obstante, la toxicidad de las proteínas Cry1 no se restringe sólo a los lepidópteros. Por ejemplo, las proteínas Cry1Ba y Cry11a demostraron poseer también toxicidad para coleópteros (12, 52, 86, 99, 120) y la proteína Cry1Ca para dípteros (115). Sucede algo similar con la proteína Cry2Aa, que es tóxica para dípteros también (136). En la Tabla 3 se presentan en forma detallada las proteínas Cry y Vip tóxicas para lepidópteros, como así también las familias y especies de insectos susceptibles.

## BIOINSECTICIDAS A BASE DE *B. THURINGIENSIS*

Los bioinsecticidas desarrollados en los inicios y muchos otros usados en la actualidad incluyen en su formulación como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de *B. thuringiensis*. Estos productos tienen como limitación que presentan una especificidad restrin-

**Tabla 3.** Toxicidad de proteínas Cry y Vip para insectos lepidópteros.

Familia	Especie susceptible	Proteínas tóxicas
Arctiidae	<i>Hyphantria cunea</i> <i>Spilosoma virginica</i>	Cry1Aa Cry1Ac
Bombycidae	<i>Bombyx mori</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Da, Cry1Db, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry9Ca, Cry9Ec, Vip3Aa
Crambidae	<i>Diatraea grandiosella</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Marasmia patnalis</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca Cry1Aa, Cry1Ab Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa
Danainae	<i>Danaus plexippus</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9Ca
Gelechiidae	<i>Pectinophora gossypiella</i> <i>Phthorimaea operculella</i> <i>Tecia solanivora</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Bb, CryCa, Cry1Da, Cry1Ja, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry9Ca Cry1Ac, Cry2Aa, Cry9Aa, Vip3Aa Cry1Ac
Geometridae	<i>Lambida fiscellaria</i>	Cry1Da
Gracillariidae	<i>Conopomorpha cramerella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Dd, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ia
Hepialidae	<i>Wiseana cervinata</i> <i>Wiseana copularis</i> <i>Wiseana jocosa</i>	Cry1Ba Cry1Ba Cry1Ba
Lasiocampidae	<i>Malacosoma disstria</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea
Lycaenidae	<i>Cacyreus marshalli</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ja, Cry2Aa, Cry9Ca
Lymantriidae	<i>Lymantria dispar</i> <i>Orgyia leucostigma</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ja, Cry2Aa, Cry2Ab Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da
Noctuidae	<i>Actebia fennica</i> <i>Agrotis ipsilon</i> <i>Agrotis segetum</i> <i>Anticarsia gemmatalis</i> <i>Busseola fusca</i> <i>Earias vitella</i> <i>Helicoverpa armigera</i>  <i>Helicoverpa punctigera</i> <i>Helicoverpa zea</i>  <i>Heliiothis virescens</i>  <i>Mamestra brassicae</i> <i>Mamestra configurata</i> <i>Pseudoplusia includens</i> <i>Rachiplusia nu</i> <i>Sesamia calamistis</i> <i>Sesamia nonagrioides</i> <i>Spodoptera exempta</i> <i>Spodoptera exigua</i>  <i>Spodoptera frugiperda</i>  <i>Spodoptera littoralis</i> <i>Spodoptera litura</i> <i>Trichoplusia ni</i>	Cry2Aa Cry1Gc, Cry1Jc, Cry9Ca, Vip3Aa Cry1Ac, Cry9Ca Cry1Ac, Cry2Aa Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Vip3Aa Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry9Aa Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry9Aa Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Be, Cry1If, Cry1Ja, Cry1Jc, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry9Aa, Vip3Aa, Vip3Ac Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ae, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Fa, Cry1If, Cry1Ja, Cry1Jc, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ae, Cry9A, Cry9Ca, Vip3Aa Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9Ca Cry1Ab Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Jb, Cry2Aa Cry1Ac Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry2Aa Cry1Ca, Cry1Ea Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry1If, Cry1Ja, Cry2Ac, Cry9Ca, Vip3Aa Cry1Bb, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa, Cry1If, Cry1Ja, Cry2Aa, Vip3Aa, Vip3Ac Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry9Ca Cry1Db, Cry1Ia, Cry2Aa, Vip3Aa Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Gc, Cry1If, Cry1Jb, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ae, Cry9Aa, Cry9Ca
Pieridae	<i>Artogeia rapae</i> <i>Pieris brassicae</i>	Cry1Ba, Cry1Ia, Cry1Ka Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Ab



Tabla 3. Continuación

Familia	Especie susceptible	Proteínas tóxicas
Plutellidae	<i>Plutella xylostella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Gb, Cry1Gc, Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Id, Cry1Ie, Cry1If, Cry1Ja, Cry1Jc, Cry9Aa, Cry9Ca, Cry9Ec, Vip3Aa
Pyralidae	<i>Chilo partellus</i>	Vip3Aa
	<i>Chilo suppressalis</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Aa, Cry9Ca
	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa
	<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Cry2Aa
	<i>Eldana saccharina</i>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa
	<i>Ephestia kuehniella</i>	Cry1Ac, Cry2Aa, Vip3Aa
	<i>Galleria mellonella</i>	Cry9Aa
	<i>Maruca vitrata</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry2Aa
	<i>Plodia interpunctella</i>	Cry1Ab, Cry1Ca, Cry2Aa, Cry9Ec
	<i>Ostrinia furnacalis</i>	Cry1Ie
	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Fa, Cry1Gc, Cry1Ia, Cry1If, Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ae, Cry9Aa, Cry9Ca
		<i>Sciropophaga incertulas</i>
	<i>Tryporyza incertulas</i>	Cry2Aa
Sphingidae	<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry9Ca, Cry15Aa, Vip3Aa
Thaumetopoeidae	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba
Tortricidae	<i>Argyrotaenia citrana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa
	<i>Choristoneura fumiferana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry9Ca
	<i>Choristoneura rosaceana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa
	<i>Choristoneura occidentalis</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Fa
	<i>Choristoneura pinus pinus</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac
	<i>Ctenopsuestis obliquana</i>	Cry1Ac, Cry9Aa
	<i>Cydia pomonella</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Da, Cry1Fa, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry15Aa
	<i>Epinotia aporema</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry9Ca
	<i>Ephiphyas postvitta</i>	Cry1Ac, Cry9Aa
	<i>Leguminivora glycinivorella</i>	Cry1Ie
	<i>Pandemis pyrusana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa
	<i>Planotortrix octo</i>	Cry1Ac, Cry9Aa
	<i>Platynota stultana</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa

gida a ciertos órdenes de insectos, potencia baja y toxicidad residual corta. A pesar de ello, han sido los agentes de control biológico más populares (13). A partir de la entrada al mercado del primer producto comercial a base de *B. thuringiensis* llamado "Sporoine", en Francia en 1938, existió un interés creciente, que sigue aún hoy, en desarrollar productos más avanzados, como se verá en los párrafos subsiguientes.

*B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 es por excelencia la cepa utilizada para el control de insectos lepidópteros, plagas agrícolas y forestales. Esta cepa fue aislada originalmente por Dulmage en 1970, lo que constituye un hito en la historia del uso de *B. thuringiensis* como larvicida, ya que fue la responsable de que los productos a base de *B. thuringiensis* puedan competir con los insecticidas químicos en términos de eficiencia. Esta cepa resultó ser hasta 200 veces más tóxica para algunas especies de

lepidópteros que las otras cepas utilizadas en los productos de aquella época.

*B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 es una de las cepas de *B. thuringiensis* mejor estudiadas y se caracteriza por la portación de los siguientes genes *cry* antilepidópteros: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia* (58, 102). El descubrimiento de *B. thuringiensis* svar. *israelensis* (44), para el control de larvas de mosquitos y jejenes, expandió el uso de *B. thuringiensis* como bioinsecticida.

La mayoría de los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* se producen empleando un número reducido de cepas y utilizan sólo una pequeña proporción de las proteínas Cry conocidas. En los laboratorios del IMYZA-INTA, contamos con una colección de más de 300 cepas nativas que hemos aislado de suelo, filoplano de plantas, residuos de la molienda de granos, larvas de insectos

muestras y telarañas, a partir de muestras provenientes de regiones agroecológicas diversas de nuestro país. La mayoría de los cristales de estas cepas están caracterizados mediante microscopía de contraste de fases, SDS-PAGE, PCR con cebadores generales y específicos para diversos genes *cry* y mediante ensayos biológicos de toxicidad frente a miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera*, y constituyen una fuente de recursos biológicos y genéticos muy rica.

El uso de este tipo de insecticidas biológicos en Argentina es limitado debido, en gran parte, a que los productos comerciales registrados y disponibles en el mercado son importados y caros, en comparación con los insecticidas químicos. El INTA cuenta actualmente con un bioinsecticida de primera generación a base de una cepa nativa de *B. thuringiensis* dirigido al control de larvas de insectos lepidópteros, totalmente desarrollado por nuestro grupo, que pronto será registrado y que tenderá a superar las limitaciones mencionadas.

### Bioinsecticidas de primera generación

Son aquellos cuya formulación incluye como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de *B. thuringiensis*. Constituyen la mayor proporción de los productos comerciales que se utilizan en el mundo (Tabla 4). Estos productos se encuentran disponibles en diferentes tipos de formulaciones, tanto líquidas como sólidas. Estas formulaciones satisfacen en el presente los requerimientos de distintos ámbitos, desde la agricultura hasta la salud pública (85, 89).

Estos productos se utilizan en el sector agrícola, principalmente para el control de plagas lepidópteras en cultivos de maíz, trigo, sorgo, soja, algodón y frutales. Aunque su uso es limitado en comparación con los insecticidas convencionales, existe un interés creciente en el manejo integrado de plagas (según la FAO: “*cuidadosa consideración de todas las técnicas disponibles para combatir las plagas y la posterior integración de medidas apropiadas que disminuyen el desarrollo de las mismas y mantienen el empleo de plaguicidas y otras intervenciones a niveles económicamente justificados y que reducen al mínimo los riesgos para la salud humana y el ambiente*”). Dicho interés se debe al menor riesgo de desarrollo de resistencia, a políticas nacionales sobre el uso de los pesticidas convencionales y a los costos altos del desarrollo de insecticidas químicos nuevos. Todas estas observaciones sugieren que los agentes de control biológico, en general, incrementarían su uso e importancia en los próximos años.

### Bioinsecticidas de segunda generación

Son aquellos constituidos por una mezcla de esporas y cristales provenientes de una cepa de *B. thuringiensis* a la cual se le introdujo mediante algún mecanismo de transferencia de genes, ya sea transformación, transducción y/o conjugación, genes *cry* presentes en otras ce-

pas de *B. thuringiensis* y no en la receptora, lo que permite ampliar su espectro de actividad hacia otros insectos plaga o aumentar su toxicidad mediante un efecto sinérgico o aditivo. Los productos a base de *B. thuringiensis* modificados genéticamente pueden involucrar otras manipulaciones, como la recombinación específica de sitio, curación de plásmidos, mutagénesis *in vitro* y construcción de proteínas Cry híbridas.

El uso de *B. thuringiensis* como huésped de otros genes distintos de los que poseía la cepa original ofrece una serie de ventajas. Las cepas de *B. thuringiensis* pueden mantener de manera estable y expresar eficientemente varios genes *cry*; esto les permite aumentar la toxicidad para un insecto plaga determinado en forma aditiva o sinérgica. Distintos genes *cry* con diferentes modos de acción o diferentes propiedades de unión al receptor pueden reducir la posibilidad de desarrollo de resistencia (119).

Existen productos a base de cepas de *B. thuringiensis* transconjugantes, como es el caso de los productos Condor® y Cutglass®. Para su obtención, un plásmido autotransferible que porta un gen *cry1A* de una cepa del svar *aizawai* fue transferido por conjugación a una cepa receptora del svar *kurstaki*, y un plásmido que contiene un gen *cry1* de una cepa del svar *kurstaki* fue transferido por conjugación a una cepa receptora del svar *aizawai*, respectivamente. El ingrediente activo del producto Foil® OF produce las proteínas Cry1Ac y Cry3A, y presenta toxicidad para plagas de lepidópteros y coleópteros. Esta ampliación en el rango de huéspedes fue lograda mediante la transferencia de un plásmido portador del gen *cry3A* de *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* a una cepa del svar. *kurstaki* (40).

Existen otros desarrollos con el objeto de obtener este tipo de productos que no han sido registrados. Un ejemplo de estos fue detallado por Kalman *et al.* (68). Desarrollaron una cepa a la que se le introdujo de manera estable el gen *cry1C* de *B. thuringiensis* svar. *aizawai* (gen con actividad tóxica para *Spodoptera*, que no se encuentra en *B. thuringiensis* svar. *kurstaki*) dentro de *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-73 (que sólo contiene *cry1Ac*), de esta forma se logró ampliar el rango de huéspedes susceptibles.

### Bioinsecticidas de tercera generación

Son aquellos cuya formulación contiene bacterias recombinantes que han sido modificadas genéticamente con genes *cry* o cepas de *B. thuringiensis* modificadas con otros genes que codifican otros factores de virulencia distintos de las  $\delta$ -endotoxinas. Estos productos se desarrollaron con el objetivo de resolver la limitación de la toxicidad residual corta que poseen los productos de primera generación, o simplemente de aumentar la toxicidad hacia los insectos. Una estrategia que permitió obtener un tipo de estos productos consistió en el uso de bacterias recombinantes muertas, con el objeto de obte-

**Tabla 4.** Bioinsecticidas de primera generación tóxicos para lepidópteros disponibles en el mundo.

Nombre comercial	Compañía	Serovar de <i>B. thuringiensis</i>	Orden de insectos blanco	Proteínas Cry
Dipel, Biobit XL, Foray	Abbott Labs.	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Florbac, Xentari		<i>aizawai</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca, 1Da</b>
Futura		<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Bernan Bt	Bactec	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Bathurin	Chamapol-Biokrna	<i>thuringiensis</i>	Lepidópteros	<b>ND</b>
Bactis	Compagnia di Recerca chim. CRC	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Biospor	Farbwerke- Hoechst	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Cutlass	Fermenta ASC Co.	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Muscabac	Farmos	<i>thuringiensis</i>	Lepidópteros	<b>β-exotoxina</b>
DendroBacillin	Glavmikro-	<i>dendrolimus</i>	Lepidópteros	<b>ND</b>
EndoVacterin	bioprom	<i>galleriae</i>	Lepidópteros	<b>1Cb</b>
Insektin		<i>thuringiensis</i>	Lepidópteros	<b>1Ba</b>
Mianfeng pesticide	Huazhong Agricultural	YBT-1520	Lepidópteros	<b>ND</b>
Shuangdu preparation	University	chinesensis Ct-43	Lepidópteros y coleópteros	<b>ND</b>
Bitayon	Jewin-Joffe Industry Limited	ND	Lepidópteros	<b>ND</b>
Larvo-Bt	Knoll Bioproducts	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Bt	Korea Explosives	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Selectgyn	Kyowa-Hakko Kogyo Co.	<i>aizawai</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca, 1Da</b>
Sporoine	LIBEC	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
M-Peril	Mycogen	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Biobit	Novo Nordisk	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Foray		<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
SOK	Nor-Am Chemical	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Bactospeine	Philips	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Plantibac	Procida	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Baturad	Radonja	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Nubilacid		<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab.</b>
Bt 8010, Rijan	Scientific & Technology Developing	ND	Lepidópteros	<b>ND</b>
Delfin, Thuricide	SDS Biotech K.K.	ND	Lepidópteros	<b>ND</b>
Able	Thermo	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>ND</b>
Thuricide	Trilogy Corporation	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Javelin, Delfin		<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
CoStar		<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Steward		<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Vault		<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Bacillex	Shionogi Co	<i>thuringiensis</i>	Lepidópteros	<b>β-exotoxina</b>
Bactur	Thompsoni Hayward Co.	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Toaro, Toaro-Ct	Towagosei Chem	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	<b>1Aa, 1Ab, 1Ac, 2Aa, 2Ab</b>
Spicturin	Tuticorin Alkali Chemicals and Fertilisers Limited	<i>galleriae</i>	Lepidópteros	<b>1Cb</b>

ner un sistema nuevo de utilización de las proteínas Cry (38). La compañía Mycogen desarrolló una estrategia que implica el encapsulamiento de varias proteínas Cry dentro de células de *Pseudomonas fluorescens*. A este sistema se lo llamó CellCap® y consiste en matar las células transformadas durante la fase estacionaria de crecimiento mediante un tratamiento físico o químico. La ventaja que brinda este sistema sobre los convencionales sería que la célula de *Pseudomonas fluorescens* protege a las proteínas Cry de *B. thuringiensis* de la degradación causada por el medio ambiente, y otorga una actividad insecticida residual más prolongada.

Existen otros bioinsecticidas que no fueron registrados aún, que se obtuvieron insertando genes *cry* de *B. thuringiensis* en otros microorganismos. Estos fueron seleccionados teniendo en cuenta su capacidad de colonizar el hábitat del insecto blanco del tratamiento, con la idea de que los organismos transformados puedan sintetizar de forma continua cantidades suficientes de proteína Cry para evitar el daño causado por el insecto (42). Se llevaron a cabo varios estudios en los cuales se insertaron genes específicos con toxicidad para lepidópteros en bacterias que colonizan externamente la superficie de hojas y raíces de plantas, tales como *Pseudomonas cepacia* (118), *Pseudomonas fluorescens* (94, 128) y *Bacillus megaterium* (11), o internamente, tales como *Clavibacter xyly* (75).

El inconveniente que acarrea la introducción de genes *cry* en otras bacterias distintas de *B. thuringiensis* es que involucra la liberación de microorganismos recombinantes, los que presentan muchas restricciones de regulación en su uso. Una de ellas se relaciona con la posible inestabilidad de la característica que se introduce, como por ejemplo, que los genes insertados se transfieran a otras especies bacterianas (123). No obstante, se han utilizado distintas estrategias para minimizar este problema. Con este objeto se utilizaron derivados del transposón Tn5 transposasa negativos (94) o “vectores suicidas”, cuya integración es dependiente de la recombinación entre secuencias de ADN homólogas (128).

Existen también otros bioinsecticidas de tercera generación —ninguno de ellos registrado—, en los que su principio activo son cepas de *B. thuringiensis* modificadas genéticamente mediante la inserción de genes que codifican para otros factores de virulencia distintos de las  $\delta$ -endotoxinas. Estos bioinsecticidas también poseen restricciones en cuanto a su regulación de uso.

Vale la pena destacar los desarrollos informados por Thamthiankul *et al.* (121) y Zhu *et al.* (141), realizados con el objetivo de controlar insectos lepidópteros. En el primero de ellos lograron una cepa recombinante de *B. thuringiensis* svar. *aizawai* que demostró una toxicidad mejorada para *Spodoptera exigua* con respecto a la cepa salvaje, mediante la expresión cromosomal de un gen de quitinasa durante la etapa de esporulación; ese gen no se encontraba en la cepa salvaje (recordar que los genes

*cry* se expresan durante la esporulación). La actividad de quitinasa puede hidrolizar la quitina de la membrana peritrófica del insecto blanco, lo que forma poros y permite que una mayor cantidad de toxina Cry alcance las células epiteliales del intestino medio del insecto (61). En el segundo trabajo, a partir de una cepa comercial de *B. thuringiensis* muy tóxica para *Helicoverpa armigera* y *Plutella xylostella* obtuvieron una bacteria recombinante que expresa de manera estable el gen *vip3Aa7*. De esta forma se logró aumentar la toxicidad para los insectos mencionados, y además, ampliar su rango de toxicidad a *Spodoptera exigua*, un insecto plaga que era naturalmente resistente a la cepa salvaje.

## PLANTAS TRANSGÉNICAS Bt

La ingeniería genética desarrolló muchas especies de plantas que expresan genes *cry* de *B. thuringiensis* y las convirtió así en “plantas insecticidas”. Comúnmente se hace referencia a este tipo de plantas como “plantas o cultivos Bt” (por ejemplo, maíz Bt, algodón Bt, etc.). El primer informe de una planta transgénica con un gen *cry* de *B. thuringiensis* data de 1987 (126). Se desarrollaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que producían cantidades suficientes de proteína Cry para controlar larvas de primer estadio de *Manduca sexta*. Desde entonces, al menos diez tipos de genes *cry* distintos se introdujeron en 26 especies vegetales: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry1Ca*, *cry1H*, *cry2Aa*, *cry3A*, *cry6A* y *cry9C*.

El empleo de este tipo de plantas posee la ventaja de reducir la necesidad de aplicar insecticidas y de proveer una protección duradera a lo largo de la temporada de cultivo. Otra característica muy importante que poseen es que los únicos insectos expuestos a la toxina son aquellos que se encuentran alimentándose de los cultivos y no otros. No obstante, la mayor ventaja de estas plantas Bt es que brindan a los agricultores una alternativa al uso de pesticidas químicos tradicionales y constituyen una herramienta para el control de plagas de importancia económica que son difíciles de controlar por los primeros. Todas estas ventajas se verían reflejadas finalmente en beneficios enormes para la producción de alimentos y en una calidad medioambiental mejor en todo el mundo (60, 69).

Por otro lado, las plantas Bt poseen la gran desventaja que radica en la posible generación de resistencia en ciertas poblaciones naturales de insectos que se alimentan de ellas. Este fenómeno determinaría la inutilización de determinadas proteínas Cry para su control, ya sea mediante su empleo en plantas transgénicas o con los bioinsecticidas que los contengan (47).

En el año 2002 se aprobó en los Estados Unidos de América y en Australia el uso comercial de una planta transgénica de algodón que produce de manera simultánea las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab (140). Los modelos

**Tabla 5.** Plantas transgénicas Bt aprobadas para su comercialización en Argentina <sup>(1)</sup>.

Planta / Línea transgénica	Compañía	Descripción
<b>Algodón</b> MON531/757/1076	Monsanto	- Algodón resistente a insectos plaga, expresa el gen <i>cry1Ac</i> de <i>B. thuringiensis</i> svar. <i>kurstaki</i> HD-73.
<b>Maíz</b> Event 176	Syngenta Seeds	- Maíz resistente a insectos plaga, expresa el gen <i>cry1Ab</i> de <i>B. thuringiensis</i> svar. <i>kurstaki</i> . Esta modificación le brinda protección frente al ataque del barrenador europeo del maíz ( <i>Ostrinia nubilalis</i> ).
<b>Maíz</b> BT11 (X4334CBR, X4734CBR)	Syngenta Seeds	- Maíz resistente a insectos plaga y tolerante a herbicida, expresa el gen <i>cry1Ab</i> de <i>B. thuringiensis</i> svar. <i>kurstaki</i> y el gen de la fosfotricina N-acetiltransferasa de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
<b>Maíz</b> DBT418	Dekalb Genetics	- Maíz resistente a insectos plaga y tolerante a herbicida, expresa el gen <i>cry1Ac</i> de <i>B. thuringiensis</i> svar. <i>kurstaki</i> y el gen de la fosfotricina N-acetiltransferasa de <i>S. hygroscopicus</i> .
<b>Maíz</b> MON810	Monsanto	- Maíz resistente a insectos plaga, expresa un gen <i>cry1Ab</i> truncado de <i>B. thuringiensis</i> svar. <i>kurstaki</i> HD-1. Esta modificación le brinda protección frente al ataque del barrenador europeo del maíz ( <i>O. nubilalis</i> ).
<b>Maíz</b> MON-ØØ6Ø3-6 x MON-ØØ81Ø-6	Monsanto	- Maíz resistente a insectos plaga y tolerante a herbicida, derivado del cruzamiento de las líneas parentales NK603 y MON810.
<b>Maíz</b> TC1507	Mycogen	- Maíz resistente a insectos plaga y tolerante a herbicida, expresa el gen <i>cry1F</i> de <i>B. thuringiensis</i> svar. <i>aizawai</i> y el gen de la fosfotricina N-acetiltransferasa de <i>S. viridochromogenes</i> .

<sup>(1)</sup> Adaptado de AGBIOS (Agriculture & Biotechnology Strategies, Inc.) (1).

teóricos actuales sugieren que las plantas que expresan dos genes *cry* diferentes (o un gen *cry* y otro de distinto tipo, como uno *vip*), que son reconocidos por al menos un receptor distinto son más efectivos en el control de insectos plaga y tendrían el potencial de demorar la aparición de resistencia (140).

Hasta el presente, existen autorizadas para su cultivo y comercialización una línea transgénica de algodón Bt y seis de maíz Bt (Tabla 5) (1).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBIOS (Agriculture & Biotechnology Strategies, Inc.). GMO Database. 2008; <http://www.agbios.com/dbase.php>.
- Armengol G, Escobar M, Maldonado M, Ordúz S. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 77-88.
- Barboza-Corona J, Nieto-Mazzocco E, Velázquez-Robledo R, Salcedo-Hernández R, Bautista M, Jiménez B, Ibarra J. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1023-9.
- Barboza-Corona J, Reyes-Ríos D, Salcedo-Hernández R, Bideshi D. Molecular and Biochemical Characterization of an Endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *Mol Biotechnol* 2008; 39: 29-37.
- Baum J, González J. Mode of replication, size and distribution of naturally occurring plasmids in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 96: 143-8.
- Benintende G, López-Meza J, Cozzi J, Ibarra J. Novel non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 151-5.
- Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, Barak Z, Sinai R, Manashherob R, et al. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4883-90.
- Bhalla R, Dalal M, Panguluri S, Jagadish B, Mandaokar A, Singh A, et al. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243: 467-72.
- Boonserm P, Davis P, Ellar D, Li J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol* 2005; 348: 363-82.
- Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution. *J Bacteriol* 2006; 188: 3391-401.
- Bora R, Murty M, Shenbargarathai R, Sekar V. Introduction of Lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phylloplane. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 214-22.
- Bradley D, Harkey M, Kim M, Biever K, Bauer L. The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J Invertebr Pathol* 1995; 65: 162-73.
- Brar S, Verma M, Tyagi R, Valéro J. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochem* 2006; 41: 323-42.
- Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1667: 38-46.

15. Bravo A, Sarabia S, López L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, *et al.* Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4965-72.
16. Broderick N, Raffa K, Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 15196-9.
17. Brown K, Whiteley H. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. *J Bacteriol* 1992; 174: 549-57.
18. Bulla L, Bechtel D, Kramer K, Shethna Y, Aronson A, Fitz-James P. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit Rev Microbiol* 1980; 8: 147-204.
19. Burton S, Ellar D, Li J, Derbyshire D. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J Mol Biol* 1999; 287: 1011-22.
20. Cannon R. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. *Biol Rev* 1996; 71: 561-636.
21. Carlton BC, González JM. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. En: Dudnan, editors. *The molecular biology of the bacilli*. 1985, p. 211-49.
22. Cerón J, Covarrubias L, Quintero R, Ortiz A, Ortiz M, Aranda E, *et al.* PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 353-6.
23. Cerón J, Ortiz A, Quintero R, Guereca L, Bravo A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3826-31.
24. Crickmore N, Ellar D. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned *CryIIA* delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* 1992; 6: 1533-7.
25. Crickmore N, Zeigler D, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, *et al.* Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 807-13.
26. Crickmore N, Zeigler D, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2008; [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)
27. Chen X, Lee M, Dean D. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9041-5.
28. Chen F, Tsai M, Peng C, Chak K. Dissection of *cry* gene profiles of *Bacillus thuringiensis* isolates in Taiwan. *Curr Microbiol* 2004; 48: 270-5.
29. Choi S, Shin B, Kong E, Rho H, Park S. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis cry1I*-type crystal protein gene. *Curr Microbiol* 2000; 41: 65-9.
30. Dankocsik C, Donovan W, Jany C. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *Mol Microbiol* 1990; 4: 2087-94.
31. Derbyshire D, Ellar D, Li J. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin *Cry1Ac* and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallogr sect D* 2001; 57: 1938-44.
32. de Maagd R, Bravo A, Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* 2001; 17: 193-9.
33. de Maagd R, Kwa M, van der Klei H, Yamamoto T, Schipper B, Vlak J, *et al.* Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin *CryIA(b)* results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 1537-43.
34. Donovan W, Donovan W, Engleman J, Donovan J, Baum J, Bunkers G, *et al.* Discovery and characterization of *Sip1A*: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72: 713-9.
35. Ejiófor A, Johnson T. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002; 28: 284-90.
36. Estruch J, Warren G, Mullins M, Nye G, Craig J, Koziel M. *Vip3A*, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5389-94.
37. Farkas J, Sebesta K, Horská K, Samek Z, Dolíjls J, Storm F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. *Coll Czech Chem Com* 1969; 34:1118-20.
38. Gaertner F, Quick T, Thompson M. CellCap: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins. En: Kim, L, editor. *Advanced engineered pesticides*. Marcer Dekker, 1993, p. 73-83.
39. Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, *et al.* Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin *Cry3Bb1* of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001; 57: 1101-9.
40. Gawron-Burke C, Baum J. Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria. *Genet Eng (NY)* 1991; 13: 237-63.
41. Ge A, Shivarova N, Dean D. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4037-41.
42. Gelernter W. Targeting insecticide-resistance markers: new developments in microbial based product. Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies. American Chemical Society – USA 1990; 4221: 105-17.
43. Gleave A, Williams R, Hedges R. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1683-7.
44. Goldberg L, Margalit J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq News* 1977; 37: 355-8.
45. Gómez I, Arenas I, Benítez I, Miranda-Ríos J, Becerril B, Grande R, *et al.* Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* *Cry1Ab* toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 2006; 281: 34032-9.
46. Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* *Cry1Ab* toxin. *FEBS Lett* 2002; 513: 242-6.
47. González-Cabrera J. Plantas transgénicas con la capacidad insecticida de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero P, Ferré J, editores. *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*, 2001, p. 169-87.
48. González J, Dulmage H, Carlton B. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 1981; 5: 352-65.
49. Gordon R, Haynes W, Pang C. The genus *Bacillus*. En: *US Department of Agriculture handbook N° 427*. Washington DC., USDA, 1973, p. 109-26.
50. Griko N, Rose-Young L, Zhang X, Carpenter L, Candas M, Ibrahim MA, *et al.* Univalent binding of the *Cry1Ab* toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. *Biochemistry* 2007; 46: 10001-7.
51. Grochulsky P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M,

- Schwartz L, Brousseau R, *et al.* *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol* 1995; 254: 447-64.
52. Grossi-de-Sa M, Quezado de Magalhaes M, Silva M, Silva S, Dias S, Nakasu E, *et al.* Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry11a-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40: 773-82.
  53. Guerchicoff A, Delécluse A, Rubinstein C. The *Bacillus thuringiensis* *cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1090-6.
  54. Guerchicoff A, Ugalde R, Rubinstein C. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2716-21.
  55. Guttman D, Ellar D. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 188: 7-13.
  56. Hernández C, Andrew R, Bel Y, Ferré F. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *J Invertebr Pathol* 2005; 88: 8-16.
  57. Herrero S, González-Cabrera J, Ferré J, Bakker P, de Maagd R. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem J* 2004; 384: 507-13.
  58. Höfte H, Whiteley H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 1989; 53: 242-55.
  59. Hongyu Z, Ziniu Y, Wangxi D. Composition and ecological distribution of *cry* proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. *J Invertebr Pathol* 2000; 76: 191-7.
  60. Hossain F, Pray C, Lu Y, Huang J, Fan C, Hu R. Genetically modified cotton and farmers' health in China. *Int J Occup Environ Health* 2004; 10: 296-303.
  61. Huber H, Lüthy P. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: composition and activation. Davidson editor. Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. New Jersey, U.S.A., 1981.
  62. Ibarra J, Federici, B. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol* 1986; 165: 527-33.
  63. Jansens S, van Vliet A, Dickburt C, Buysse L, Piens C, Saey B, *et al.* Transgenic corn expressing a Cry9C insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage. *Crop Sci* 1997; 37: 1616-24.
  64. Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincón G, Damián-Almazo J, Gill S, *et al.* *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem* 2007; 282: 21222-9.
  65. Juárez-Pérez V, Ferrandis M, Frutos R. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* *cry* genes. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2997-3002.
  66. Juárez-Pérez V, Guerchicoff A, Rubinstein C, Delécluse A. Characterization of Cyt2Bc toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2997-3002.
  67. Jurat-Fuentes J, Adang M. Characterization of a Cry1A-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem* 2004; 271: 3127-35.
  68. Kalman S, Kiehne K, Cooper N, Reynoso M, Yamamoto T. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3063-8.
  69. Khetan S. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan editor. *Microbial Pest Control*, 2001, p. 14.
  70. Kim H. Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. *Curr Microbiol* 2000; 41: 250-6.
  71. Klier A, Fargette F, Ribier J, Rapoport G. Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain Berliner 1715. *EMBO J* 1982; 1: 791-9.
  72. Klier A, Rapoport G. Cloning and heterospecific expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis*. *EMBO J*. En: Alout J, Fehrenbach F, Free J, Jalljaszenice J, editors. *Bacterial protein toxins*, 1984, p. 65-72.
  73. Knowles B. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Advan Insect Physiol* 1994; 24: 175-308.
  74. Kostichka K, Warren G, Mullins M, Mullins A, Palekar N, Craig J, *et al.* Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. *J Bacteriol* 1996; 178: 2141-4.
  75. Lampel J, Canter G, Dumock M, Kelly J, Anderson J, Uratani B, *et al.* Integrative cloning, expression and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 501-8.
  76. Lecadet M. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*. Classified by H serotypes. 1998. Institut Pasteur. Paris.
  77. Lechner S, Mayr R, Francis K, Pruss B, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, *et al.* *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 1373-82.
  78. Lee M, Walters F, Hart H, Palekar N, Chen J. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4648-57.
  79. Li J, Carroll J, Ellar D. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 1991; 353: 815-21.
  80. Li J, Derbyshire D, Promdonkoy B, Ellar D. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 571-7.
  81. Liu Y, Sui M, Ji D, Wu I, Chou C, Chen C. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J Invertebr Pathol* 1993; 62: 131-6.
  82. Loeza-Lara P, Benintende G, Cozzi J, Ochoa-Zarzosa A, Baizabal-Aguirre V, Valdez-Alarcón J, *et al.* The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadtensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. *Plasmid* 2005; 54: 229-40.
  83. López-Meza J, Ibarra J. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 1306-10.
  84. Lu H, Rajamohan F, Dean D. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1Aa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J Bacteriol* 1994; 176: 5554-9.
  85. Mahilum M, Ludwig M, Madon M, Becker N. Evaluation of the present dengue situation and control strategies against *Aedes aegypti* in Cebu City, Philippines. *J Vector Ecol* 2005; 30: 277-83.
  86. Martins E, Aguiar R, Martins N, Melatti V, Falcão R, Gomes A, *et al.* Recombinant Cry11a protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J Appl Microbiol* 2008 104: 1363-71.
  87. Masson L, Erlandson M, Puzstai-Carey M, Brousseau R,

- Juárez-Pérez V, Frutos R. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4782-8.
88. Masson L, Tabashnik B, Mazza A, Préfontaine G, Potvin L, Brousseau R, *et al.* Mutagenic analysis of a conserved region of domain III in the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 194-200.
  89. Maxwell E, Fadamiro H, McLaughlin J. Suppression of *Plutella xylostella* and *Trichoplusia ni* in cole crops with attracticide formulations. *J Econ Entomol* 2006; 99: 1334-44.
  90. McGaughey W, Whalon M. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 1992; 258: 1451-5.
  91. Morse R, Yamamoto T, Stroud R. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 2001; 9: 409-17.
  92. Nakamura K, Oshie K, Shimizu M, Takada Y, Oeda K, Ohkawa H. Construction of chimeric insecticidal proteins between the 130-kDa and 135-kDa proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for analysis of structure-function relationship. *Agric Biol Chem* 1990; 54: 715-24.
  93. Nakamura L. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 1031-5.
  94. Obukowicz M, Perlak F, Kusano-Kretzmer K, Mayer E, Bolten S, Watrud L. Tn5-mediated integration of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing pseudomonads. *J Bacteriol* 1986; 168: 982-9.
  95. Pardo-López L, Gómez I, Muñoz-Garay C, Jiménez-Juárez N, Soberón M, Bravo A. Structural and functional analysis of the pre-pore and membrane-inserted pore of Cry1Ab toxin. *J Invertebr Pathol* 2006; 92: 172-7.
  96. Porcar M, Juárez-Pérez V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 26: 419-32.
  97. Pusztai M, Fast P, Gringorten L, Kaplan H, Lessard T, Carey P. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem J* 1991; 273: 43-7.
  98. Rajamohan F, Hussain S, Cotrill J, Gould F, Dean D. Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb delta-endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J Biol Chem* 1996; 271: 25220-6.
  99. Ruiz de Escudero I, Estela A, Porcar M, Martínez C, Oguiza J, Escrache B, *et al.* Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4796-804.
  100. Salehi Jouzani G, Pourjan Abad A, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B. Distribution and diversity of dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008; 35: 83-94.
  101. Sanchis V, Lereclus D, Menou G, Chaufaux J, Lecadet M. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol Microbiol* 1988; 2: 393-404.
  102. Sauka D. Estudio de genes y proteínas insecticidas de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Aportes al conocimiento de su distribución y toxicidad en plagas agrícolas. Tesis Doctoral. UBA. Director: Benintende G. 2007.
  103. Sauka D, Amadio A, Zandomeni R, Benintende G. Strategy for amplification and sequencing of insecticidal *cry1A* genes from *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2007; 91: 423-30.
  104. Sauka D, Benintende G. (Comunicación personal).
  105. Sauka D, Cozzi J, Benintende G. Screening of *cry2* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005; 88: 163-5.
  106. Sauka D, Cozzi J, Benintende G. Detection and identification of *cry1I* genes in *Bacillus thuringiensis* using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Curr Microbiol* 2006; 52: 60-3.
  107. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Fietelson J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 775-806.
  108. Schnepf H, Tomczak K, Ortega J, Whiteley H. Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem* 1990; 265: 20923-30.
  109. Schnepf H, Wong H, Whiteley H. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J Biol Chem* 1985; 260: 6264-72.
  110. Schwartz J, Potvin L, Chen X, Brousseau R, Laprade R, Dean D. Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3978-84.
  111. Sergeev N, Distler M, Vargas M, Chizhikov V, Herold K, Rasooly A. Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. *J Microbiol Methods* 2006; 65: 488-502.
  112. Shevelev A, Svarinsky M, Karasin A, Kogan Y, Chestukhina G, Stepanov V. Primary structure of *cryX\*\**, the novel delta-endotoxin-related gene from *Bacillus thuringiensis* spp. *galleriae*. *FEBS Lett* 1993; 336: 79-82.
  113. Shin B, Park S, Choi S, Koo B, Lee S, Kim J. Distribution of *cryV*-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of *cryV*-type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2402-7.
  114. Smedley D, Ellar D. Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* 1996; 142: 1617-24.
  115. Smith G, Merrick J, Bone E, Ellar D. Mosquitocidal activity of the CryIC delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 680-4.
  116. Smulevitch S, Osterman A, Shevelev A, Kaluger S, Karasin A, Kadyrov R, *et al.* Nucleotide sequence of a novel delta-endotoxin gene *cryIlg* of *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae*. *FEBS Lett* 1991; 293: 25-8.
  117. Sneath P. Spore forming gram-positive rods and cocci. En: Butler J, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1986, p. 1104-207.
  118. Stock C, McLoughlin T, Klein J, Adang M. Expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepacia* 526. *Can J Microbiol* 1990; 396: 879-84.
  119. Tabashnik B. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Ann Rev Entomol* 1994; 39: 47-79.
  120. Tailor R, Tippett J, Gibb G, Pells S, Pike D, Jordan L, *et al.* Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol Microbiol* 1992; 6: 1211-7.
  121. Thamthiankul S, Moar W, Miller M, Panbangred W. Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 65: 183-92.
  122. Thamthiankul S, Suan-Ngay S, Tantimavanich S, Panbangred W. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistanii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 56: 395-401.
  123. Tiedje J, Colwell R, Grossman Y, Hodson R, Lenski R, Mack R, *et al.* The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* 1989; 70: 298-315.
  124. Tounsi S, J'Mal A, Zouari N, Jaoua S. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry1Aa*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biotechnol Lett* 1999; 21: 771-5.



125. Uribe D, Martínez W, Cerón J. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol* 2003; 82: 119-27.
126. Vaeck M, Reynaerts A, Höfte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean D, *et al.* Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 1987; 328: 33-7.
127. van Frankenhuyzen K, Gringorten L, Gauthier D. Cry9Ca1 Toxin, a *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein with High Activity against the Spruce Budworm (*Choristoneura fumiferana*). *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4132-4.
128. Waalwijk C, Dullemans A, Maat C. Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 77: 257-64.
129. Wang J, Boets A, Van Rie J, Ren G. Characterization of *cry1*, *cry2* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J Invertebr Pathol* 2003; 82: 63-71.
130. Warren G. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. En: Carozzi N, Koziel M. (Ed.). *Advances in insect control, the role of transgenic plants*. Taylor & Francis Ltd, London. 1997; 109-21.
131. Warren G, Koziel M, Mullins M. Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins. Novartis, US patent 5770696. 1998.
132. Wasano N, Ohba M. Assignment of delta-endotoxin genes of the four lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains that produce spherical parasporal inclusions. *Curr Microbiol* 1998; 37: 408-11.
133. Wasano N, Ohba M, Miyamoto K. Two delta-endotoxin genes, *cry9Da* and a novel related gene, commonly occurring in Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* Japanese isolates that produce spherical parasporal inclusions. *Curr Microbiol* 2001; 42: 129-33.
134. West A, Burges H, White R, Wyborn C. Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. *J Invertebr Pathol* 1984; 44: 128-33.
135. Whiteley H, Schnepf H. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Microbiol* 1986; 40: 549-76.
136. Widner W, Whiteley H. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J Bacteriol* 1989; 171: 965-74.
137. Wolfersberger M, Luthy A, Maure P, Pareti F, Sacchi B, Giordana M, *et al.* Preparation and partial characterization of aminoacid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp Biochem Physiol* 1987; 86: 301-8.
138. Zhang X, Candas M, Griko N, Taussig R, Bulla L Jr. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9897-902.
139. Zhang X, Griko N, Corona S, Bulla L Jr. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 149: 581-8.
140. Zhao J, Cao J, Li Y, Collins H, Roush R, Earle E, *et al.* Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1493-7.
141. Zhu C, Ruan L, Peng D, Yu Z, Sun M. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. *Lett Appl Microbiol* 2006; 42: 109-14.