



CAPÍTULO 4

Control de insectos plaga de importancia agrícola por medio de *Bacillus thuringiensis*

Corina M Berón, Graciela L Salerno

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Argentina.
cberon@fiba.org.ar

RESUMEN

Históricamente el manejo de las poblaciones de insectos plaga se ha basado en el uso de insecticidas de naturaleza química, responsables de grandes perjuicios al medio ambiente, a la salud de las poblaciones humanas urbanas y rurales, y de la inducción de resistencia a los principios activos utilizados en los insectos. El empleo de agentes microbianos de control biológico, tales como las bacterias, constituye una alternativa promisoría desde el punto de vista técnico, económico y ambiental, ya que su acción se restringe solamente a organismos blanco, no causando efectos nocivos hacia el ecosistema, hacia el resto de las poblaciones naturales y al hombre. Por otro lado, su utilización permite reducir la contaminación de suelos y cuerpos de agua generando una mejor calidad de vida. La bacteria *Bacillus thuringiensis* es el agente de control microbiano más utilizado a nivel mundial ya que produce toxinas (o proteínas Cry) que al ser ingeridas por un insecto susceptible se unen específicamente a receptores presentes en el intestino del mismo provocando su disrupción y como consecuencia de ello la muerte del insecto.





Las investigaciones tendientes a seleccionar y caracterizar nuevas cepas de bacterias entomopatógenas, incluyendo a los genes que codifican las toxinas, representan un importante aporte al control de insectos plaga y al manejo de resistencias generadas por aplicaciones de bioformulados durante largos períodos de tiempo. El objetivo central de esta línea de investigación es aislar y caracterizar cepas nativas de la bacteria entomopatógena *B. thuringiensis* que sean capaces de controlar poblaciones de insectos dañinos, que puedan desarrollarse como alternativas biológicas de interés regional y que puedan ser utilizados en el marco del Manejo Integrado de insectos plaga. Desde el inicio de esta línea de investigación se ha realizado el aislamiento de cepas nativas de esta bacteria, se lleva a cabo la caracterización de las toxinas presentes en ellas por medio de técnicas bioquímicas y moleculares, se han realizado ensayos de toxicidad contra insectos de los órdenes coleóptera y lepidóptera y se han desarrollado diversas metodologías moleculares para identificar y caracterizar proteínas Cry.

INTRODUCCIÓN

Muchas prácticas agrícolas que se utilizan en la actualidad son responsables del aumento en la cantidad y calidad de muchos productos alimenticios, sin embargo, también favorecen a la multiplicación de organismos, tales como algunos insectos, que cuando se establecen en poblaciones numerosas pueden provocar daños económicos y grandes pérdidas a la producción. Tradicionalmente para el control de insectos plaga se utilizan productos químicos sintéticos, sin embargo, el uso excesivo de este tipo de productos traen aparejadas importantes consecuencias negativas, como la contaminación de aguas, suelos y alimentos, efectos tóxicos en la flora y la fauna no blanco de su acción, concentración de estos insecticidas químicos en la cadena alimentaria y selección de poblaciones de insectos resistentes a dichos productos. Como respuesta al desarrollo de resistencia a muchos agrotóxicos por parte de algunos insectos, se han producido productos aún más tóxicos, resultando en la mayoría de los casos más peligrosos y de mayor residualidad en el ambiente. A esta serie de aspectos adversos debe sumarse el interés público, y en aumento, por la preservación del medio ambiente. Todas estas consideraciones han sido las principales causas que han llevado a buscar alternativas más seguras para el ser humano, el medio ambiente y otros organismos, en el control y manejo de poblaciones de insectos plaga [1]. Una de las alternativas más promisorias al uso de insecticidas





químicos es el empleo de microorganismos entomopatógenos en el control de insectos dañinos. Entre éstos, la bacteria *Bacillus thuringiensis*, ha resultado tener un importante efecto insecticida y a su vez presentar una alta especificidad. Se encuentra ampliamente demostrado que esta bacteria no es patógena para mamíferos, aves, anfibios o reptiles y que es altamente específica contra los invertebrados susceptibles [2]. Los productos basados en sus proteínas insecticidas generalmente tienen un costo de desarrollo y registro mucho menor que muchos productos sintéticos. Sumado a esto, el modo de acción de estas proteínas difiere completamente del modo de acción de los productos convencionales, y esto hace que sean componentes clave dentro de las estrategias de manejo integrado de plagas dirigido hacia la preservación de los enemigos naturales y del manejo de resistencias a los agrotóxicos por parte de los insectos plaga.

A pesar de que la bacteria *B. thuringiensis* fue determinada como tal a principios del siglo pasado, a partir de la Segunda Guerra Mundial, cuando comenzaron a divisarse las primeras dificultades provocadas por el uso de insecticidas sintéticos, se estableció como una alternativa real en el control de plagas. En la actualidad, los productos desarrollados a partir de esta bacteria constituyen los bioinsecticidas de mayor producción y aplicación en todo el mundo, representando el 90 % del mercado de los agrotóxicos de origen biológico, aunque solo constituye el 2 % de los insecticidas en su conjunto. También existen en el mercado plantas genéticamente modificadas resistentes al ataque de algunos insectos, a las que se les han incorporado genes que codifican toxinas de esta bacteria [3].

B. thuringiensis comprende un grupo de bacterias aeróbicas, Gram positivas formadoras de esporas y capaces de formar cristales de naturaleza proteica durante la esporulación, en la fase estacionaria de su ciclo celular. Esta inclusión de tipo cristalina (δ -endotoxina o cuerpo paraesporal) fue caracterizada inicialmente como patógena de insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera, aunque más recientemente se ha demostrado su toxicidad contra Ordenes de insectos como Hymenoptera, Homoptera y Mallophaga, así como de algunos Protozoos, Acaros y Nematodos. El principal factor de patogenicidad contra insectos plaga de la agricultura es la δ -endotoxina, que constituye un agregado de moléculas proteicas (proteínas Cry) y no es tóxico por sí mismo. Se trata en realidad de protoxinas de 130-140 o 60-70 kDa que deben ser solubilizadas para entonces producir la liberación de las toxinas biológicamente activas. Las δ -endotoxinas pueden formar distintos tipos de cristales,





que difieren en su forma, tamaño y patogenicidad. Hasta el momento han sido clonados y secuenciados más de 700 genes *cry* (codificantes de las proteínas Cry) a partir de diversas cepas de *B. thuringiensis* y estos genes han sido expresados en diversos organismos como *Pseudomonas*, cianobacterias y plantas para el control de plagas agrícolas y de importancia sanitaria [4, 5]. Normalmente se encuentran en grandes plásmidos (DNA extracromosómico), aunque existen excepciones en las cuales se encuentran formando parte del cromosoma bacteriano. Los genes *cry* se expresan comúnmente en la fase estacionaria del ciclo celular de la bacteria y sus productos son acumulados en la célula madre formando la inclusión cristalina que representa entre un 20 a 30 % de peso seco de un cultivo esporulado [4].

Las proteínas Cry comprenden un grupo de proteínas relacionadas, que probablemente tengan una forma de acción similar en el insecto susceptible, independientemente de la cepa de *B. thuringiensis* de la cual provengan. Se ha comprobado que cuando la protoxina de 130-140 kDa es ingerida por una larva de un insecto susceptible, es solubilizada debido al alto pH (entre 8 y 10 en lepidópteros y dípteros) de su intestino medio, y posteriormente clivada por la acción de enzimas proteolíticas presentes en el interior del intestino del insecto. Este proceso da como resultado la liberación de una molécula de menor tamaño (que puede tener una masa molecular relativa, M_r , de entre 55-70 kDa). La toxina Cry3A, específica contra coleópteros, es sólo soluble a pHs mayores que 10 y por debajo de 4, mientras que las de tipo Cry1 (específicas contra lepidópteros) requieren un pH intestinal mayor de 8,9 para su óptima activación. La alcalinidad y la presencia de agentes reductores presentes en el intestino medio del insecto son los factores principales que contribuyen a la solubilización del cristal. La capacidad de solubilizar proteínas Cry a distintos pHs es una de las determinantes de la especificidad de acción de algunas toxinas. Para ejemplificar este hecho se pueden citar ciertas protoxinas con actividad potencial contra coleópteros que sólo son tóxicas después de una activación por solubilización *in vitro*, probablemente porque la protoxina es insoluble al pH intestinal neutro a ligeramente ácido de los coleópteros, tal es el caso de la toxina Cry1Ba [6]. Para algunas combinaciones insecto-proteína cristal el proceso proteolítico juega un papel significativo en la especificidad contra el insecto blanco.

Una vez que la toxina se ha activado, se une a una proteína de unión específica (el receptor) presente en las células epiteliales de las microvellosidades del





intestino medio, se inserta parcial o completamente dentro de la membrana, provocando la formación de poros, dando como resultado la lisis de las células del intestino medio, la disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto [4].

La unión de las toxinas Cry a los receptores presentes en las células del epitelio del intestino medio del insecto susceptible es una determinante de la especificidad, la correlación entre esta unión y la toxicidad ha sido ampliamente demostrada en diversas especies de lepidópteros usando vesículas de las microvellosidades de las células intestinales (BBMV) desde las investigaciones reportadas por Wolfersberger en 1990 [7] hasta los trabajos más recientes [6]. Las principales proteínas propuestas como posibles receptores de las toxinas Cry1A en lepidópteros son una proteína de la familia de las caderinas (BtR) y la aminopeptidasa N (APN), que se encuentra anclada a la membrana a través de un grupo glicosilfosfatidil-inositol (GPI) [6]. Bravo y colaboradores [3] han demostrado que la interacción de algunas toxinas con la proteína caderina del insecto promueve un corte adicional del extremo amino terminal de la proteína Cry, esto facilitaría la formación de un oligómero o pre-poro formado por cuatro monómeros y sería responsable de la inserción a la membrana y finalmente a la formación del poro en la membrana intestinal. Para que el pre-poro se inserte a la membrana, se requiere la interacción con la APN. Experimentos en sistemas *in vitro* han demostrado en muchos casos una correlación entre la afinidad de unión de la toxina y la actividad insecticida, determinando que una alta toxicidad se corresponde con más cantidad de sitios de unión y mayor afinidad, y lo contrario para toxinas menos activas [8].

Las subespecies altamente tóxicas, registradas y utilizadas como componentes de formulados comerciales son muy limitadas. Entre ellas se incluyen las spp. *kurstaki*, *aizawai*, *israelensis* y *tenebrionis*. Por otra parte, los genes que se utilizan en la producción de plantas genéticamente modificadas se encuentran bajo patentes internacionales [9]. Por estas razones, a pesar de la gran cantidad y diversidad de proteínas descritas hasta el momento, la búsqueda de nuevas toxinas insecticidas sigue teniendo de gran interés en el área de la patología de los invertebrados. Por otro lado, aún existe un gran número de plagas que no pueden ser controladas por medio de las proteínas Cry conocidas. Finalmente, como únicamente han sido utilizadas algunas cepas de esta bacteria en la producción de formulados comerciales, se ha registrado el desarrollo de resistencias a campo por parte de las poblaciones de algunos insectos anteriormente





susceptibles a su acción. Por lo tanto, la obtención de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis* que presenten toxinas diferentes a las ya descritas, es de gran interés comercial [10]. En este contexto, el objetivo de esta línea de investigación es el aislamiento y caracterización bioquímica, toxicológica y molecular de cepas nativas de *B. thuringiensis* altamente tóxicas contra insectos de importancia agrícola.

RESULTADOS OBTENIDOS

Los trabajos realizados por este grupo de investigación inicialmente se enfocaron hacia la generación de un banco de cepas, fuente de nuevas proteínas Cry [11]. Como resultado de ello, se aislaron 41 cepas nativas de *B. thuringiensis* (Fig. 1A), principalmente a partir de muestras de suelo y utilizando técnicas básicas de microbiología, obteniéndose una colección (FCC) que fue caracterizada morfológicamente, y por sus propiedades toxicológicas y genéticas. En particular, la caracterización toxicológica se ha realizado por medio de ensayos biológicos contra los lepidópteros y coleópteros plaga de cultivos como soja, maíz, tabaco, algodón y hortalizas, entre otros, *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatallis*, *Rachiplusia nu*, *Manduca sexta*, *Anthonomus grandis*, *Diabrotica speciosa* y *Tenebrio molitor* (Fig. 1 B-D). En cuanto a la caracterización genética, hemos desarrollado nuevas estrategias para comenzar el aislamiento y caracterización de nuevos genes codificantes de proteínas Cry (genes *cry*). Una de ellas basada en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que utiliza cinco combinaciones diferentes de cebadores degenerados diseñados a partir de alineamientos de múltiples secuencias nucleotídicas de muy diversas toxinas Cry, además de reacciones de PCR anidada. Esta técnica fue validada con 13 cepas de referencia y permitió el inicio de la identificación de nuevos genes codificantes de proteínas Cry muy diversas filogenéticamente, tales como proteínas de tipo Cry8, Cry24 y tipo Cry9 [12, 13]. Por otro lado, para diferenciar diversas toxinas Cry presentes en una misma cepa desarrollamos una estrategia basada en la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) que utiliza algunos de los cebadores degenerados citados anteriormente y que nos permitió detectar diferencias entre las cepas analizadas [14]. A partir de estas y otras metodologías moleculares, como la amplificación asimétrica “Thermal Asymmetric InterLaced PCR”, TAIL-PCR [15] logramos caracterizar genes *cry* nativos, que han sido clonados y serán expresados en sistemas heterólogos



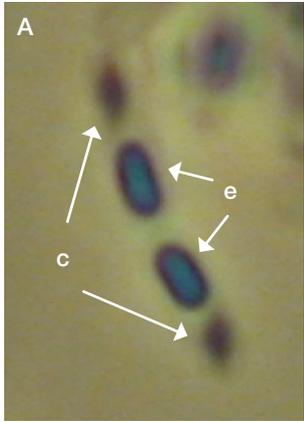


Figura 1. A) Cepa nativa de la bacteria *B. thuringiensis*; e, esporas, c, cuerpos paraesporales portadores de las proteínas Cry. B a D) Larvas del lepidóptero *R. nu*: en B), con signos de infección por bacteriosis, en C) larva sana en dieta artificial de cría en laboratorio, en D) larva sana en dieta natural.





para demostrar su actividad tóxica y posibles sinergismos con otras proteínas de esta familia. La caracterización bioquímica de las cepas bacterianas se realiza por medio de la determinación de las masas moleculares relativas de las proteínas presentes en ellas, utilizando la técnica de electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), así como su identificación por MALDI-TOF/TOF.

PERSPECTIVAS

Durante el desarrollo de esta línea de investigación se ha generado una colección de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis*, a partir de los cuales se detectaron y caracterizaron nuevas secuencias codificantes de genes *cry*, con propiedades toxicológicas diferentes a las exhibidas por las cepas de uso comercial. A su vez, fueron desarrolladas estrategias novedosas para continuar caracterizando el contenido genético de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis*. Se continuarán las actividades de caracterización bioquímica y molecular de secuencias codificantes de proteínas Cry, su expresión en sistemas heterólogos y su potencial uso como herramientas útiles para ser incorporadas dentro de las estrategias de Control Biológico de insectos actualmente utilizadas (insecticidas biológicos o diseño de genes sintéticos) y que se enmarcan dentro del Manejo Integrado de plagas.

OFERTA TECNOLÓGICA

Desde el año 2005, a través de la FIBA se vienen realizando convenios con empresas para el desarrollo de nuevos productos bioinsecticidas basados en nuevas cepas de *B. thuringiensis* y a partir de 2012 se realizan también Servicios Tecnológicos de Alto Nivel vinculados con el asesoramiento, evaluación y desarrollo de productos formulados a base de *B. thuringiensis* para el control de lepidópteros plaga. Se evalúa la calidad de los productos en cuanto a su crecimiento celular y desarrollo de cuerpos paraesporales en diversos medios de cultivo. Se realiza el asesoramiento en la elaboración de informes que son presentados ante entes regulatorios nacionales con el objetivo de obtener patentes de productos nacionales desarrollados a partir de cepas nativas de esta bacteria.



REFERENCIAS

1. Joung KB, Côte JC (2000) A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Horticultural Research and Development Center*. Technical bulletin N° 29. <http://res2.agr.ca/stjean/crdh.html>.
2. Gatehouse AM, Ferry N, Edwards MG, Bell HA (2011) Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 366(1569):1438–1452.
3. Bravo A, Likitvivatanavongb S, Gill SS, Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 41(7):423–431.
4. Schnepf HE, Wong HC, Whiteley HR (1985) The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J Biol Chem* 260(10):6264–6272.
5. Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR (2014) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature <http://www.btnomenclature.info>.
6. Pigott CR, Ellar DJ (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(2):255–81.
7. Wolfersberger MG (1990) The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* 46(5):475–477.
8. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17(4): 193–199.
9. Head GP, Greenplate J (2012) The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. *GM Crops Food* 3(3):144–53.
10. Baxter SW, Badenes-Pérez FR, Morrison A, Vogel H, Crickmore N, Kain W, Wang P, Heckel DG, Jiggins CD (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera. *Genetics* 189(2):675–9.
11. Berón CM, Salerno GL (2006) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina potentially useful in insect pest control. *BioControl* 51(6): 779–794.
12. Berón C, Curatti L, Salerno G (2005) New strategy for identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* 71(2):761–765.



13. Berón CM, Salerno GL (2007) Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. *Curr Microbiol* 54(4):271-276.
14. Vidal Domínguez ME, Pérez-Cenci M, Salerno G, Berón CM (2011) Genetic Diversity of *cry* Gene Sequences of *Bacillus thuringiensis* Strains Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Curr Microbiol* 62(3):866-870.
15. Liu YG, Whittier RF (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25(3):674-681.

