



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Departamento de Biología Celular

Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* obtenidas de muestras de suelo de alta montaña

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Isamar Guevara Rolon** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Lic. Roxana Gajardo

Instituto de Biología Experimental (IBE)

Caracas, Venezuela

Mayo- 2016

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DE LA Br. ISAMAR GUEVARA ROLON**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. **Isamar Guevara Rolon**, C.I:19.372.312, titulado "Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* obtenida de muestras de suelo de alta montaña", para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 24 días del mes de mayo del año 2016, dejando constar que la Profa. Roxana Gajardo actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Domenico Pavone



Profa. Valentina Salas



Profa. Roxana Gajardo
(Tutora)

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE ECUACIONES	IX
AGRADECIMIENTO	XI
ABREVIATURA	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
• CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	4
• HISTORIA	5
• CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	8
• CICLO DE VIDA DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	9
• CARACTERÍSTICAS DE LAS DELTA-ENDOTOXINAS	11
• CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR. <i>KURSTAKI</i>	13
• CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	14
• <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> Y <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR. <i>KURSTAKI</i>	16
• PLANTAS TRANSGÉNICAS <i>BT</i>	19
ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN	24
OBJETIVOS	26
• OBJETIVO GENERAL	26
• OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
MATERIALES	27
• MATERIAL BIOLÓGICO	27
o Cepas bacterianas	27
o Larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	28
• MEDIO DE CULTIVO PARA LARVAS DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	29
• MEDIOS DE CULTIVOS PARA EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS	29
o Medio de cultivo de referencia	29
o Medios de cultivos selectivos para el crecimiento y aislamiento de cepas de <i>Bt</i> presente en muestras de suelo	31
PLAN DE TRABAJO	33
METODOLOGÍA	34
• AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS <i>BT</i> A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO	34

o	Recolección y procesamiento de las muestras de suelo.....	34
o	Aislamiento de colonias con morfotipo de <i>Bt</i>	35
o	Observación de cristales en microscopio óptico.....	35
o	Medios de cultivos selectivos.....	35
o	Cultivo y mantenimiento de cepas bacterianas.....	36
•	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS.	36
o	Identificación de genes <i>cry</i>	36
•	ANÁLISIS DEL PATRÓN DE PROTEÍNA DEL PRODUCTO DEL GEN <i>CRY1</i>	38
o	Análisis <i>in silico</i> del cebador.....	44
•	BIOENSAYOS	45
o	Cultivo en Batch.....	45
o	Titulación bacteriana.	45
o	Obtención del complejo espora-cristal.	46
o	Montaje del bioensayo.....	47
o	Evaluación post mortem de las larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	48
RESULTADOS	49
•	AISLAMIENTO DE CEPAS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> DE MUESTRAS DE SUELO OBTENIDAS EN ALTA MONTAÑA ..	49
o	Observación de inclusiones cristalinas en <i>Bt</i>	52
o	Identificación bioquímica de los aislados.....	53
•	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS.....	55
o	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en las cepas aisladas	56
o	Patrón de proteínas de las cepas aisladas.....	58
o	Análisis <i>in silico</i> de secuencias del gen <i>cry1</i>	61
•	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CEPAS DE <i>BT</i> RECOLECTADAS EN ZONAS INTERVENIDAS (ZI) Y ZONAS NO INTERVENIDAS CON ACTIVIDAD AGRÍCOLA (ZNI)	67
•	BIOENSAYOS CON LARVAS DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	69
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	91
CONSULTAS EN LÍNEA	108
IMÁGENES	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas de la recolección de las muestras de suelo en la población de Gavidia- Edo. Mérida.	28
Tabla 2. Composición para 250 g de dieta de mantenimiento para larvas de <i>S. frugiperda</i>	29
Tabla 3. Composición de las soluciones del medio A-80	30
Tabla 4. Composición del medio Luria-Bertani para 1 L de medio.	30
Tabla 5. Composición del Medio Base Columbia.....	32
Tabla 6. Oligonucleótidos que se utilizaron como iniciadores para la determinación de los genes <i>cry1</i> en la reacción de PCR, según Bravo <i>et al.</i> (1998).....	38
Tabla 7. Composición del gel de acrilamida	41
Tabla 8. Composición de buffer de corrida Tris-Glicina	42
Tabla 9. Composición de solución de tinción de proteínas (100 mL).....	43
Tabla 10. Composición de la solución para decoloración del gel de poliacrilamidas (400 mL) ..	44
Tabla 11. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> resultantes luego del tratamiento térmico, visualización en microscopio y pruebas bioquímicas.	54
Tabla 12. Número asignado a las cepas con fenotipo característico de <i>Bt</i>	55
Tabla 13. Cuantificación de DNA de cepas aisladas de <i>Bt</i>	56
Tabla 14. Secuencias nucleotídicas del gen <i>cry1</i> extraídas de la base de datos del GeneBank. ...	62
Tabla 15. Proporciones de <i>Btk</i> proveniente de muestras de suelo de zonas intervenidas y no intervenidas con actividad agrícola.	67
Tabla 16. Formulación de la regla de decisión del estadístico de prueba	68
Tabla 17. Resultado de las pruebas de identificación de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	69
Tabla 18. Registro de mortalidad acumulada de <i>Spodoptera frugiperda</i>	70
Tabla 19. Efecto tóxico de los aislados de <i>Btk</i> sobre larvas de <i>S. frugiperda</i>	71

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Micrografía de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en microscopio electrónico de transmisión. C: cristal proteínico bipiramidal. E: espora. Tomado de Torres *et al.* (2006)..... 5
- Figura 2.** Diagrama de la esporulación en *B. thuringiensis*. (Bulla *et al.*, 1980). Tomado de <http://www.fao.org/docrep/t0533e/t0533e04.htm> 10
- Figura 3.** Estructura tridimensional de la proteína insecticida Cry1Aa producida por *Bacillus thuringiensis*. Tomado de De Maagd *et al.* (2001)..... 12
- Figura 4.** Micrografía de la inclusión cristalina de *Btk*, señalando la composición de proteínas Cry asociadas a la estructura bipiramidal del cristal paraesporal. Tomado de: 14
- Figura 5.** Dimorfismo sexual en *Spodoptera frugiperda*. A: hembra. B: macho. Tomado de: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm 15
- Figura 6.** Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*. 1: *Sf* estado adulto. 2: Ovoposición. 3: Eclosión. 4: Larva alimentándose de superficie foliar. 5: último estadio larval. 6: Formación de cámara pupal. Tomado de: <http://www.bayercropscience.com.mx/>..... 16
- Figura 7.** Modo de acción de *Bt* en una larva de Lepidóptera. 1: ingestión del complejo. 2: solubilización de los cristales. 3: activación de la toxina. 4: unión a la proteína receptora. 5: formación del poro y lisis celular. Tomado de: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/135675/fig2/> 17
- Figura 8.** Mecanismo de acción de proteínas Cry en insectos lepidópteros. 1: Unión de la toxina a caderina. 2a: inicio de la cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} . 2b: formación del pre-poro. 3: unión del oligómero a la APN y/o ALP. 4: formación del poro. 5: desequilibrio osmótico y muerte celular (Adaptado de Bravo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Tomado de (Sauka y Benintende, 2008)..... 19
- Figura 9.** Colonias aisladas con morfotipo característico de *Bt*. 49
- Figura 10.** Aislamiento de colonias de *Bt* a partir de muestras de suelo en distintas diluciones sin tratamiento con calor. Colonias totales: barra azul. Colonias con morfotipo de *Bt*: barra roja. 50
- Figura 11.** Aislamiento de colonias de *Bt* a partir de muestras de suelo tratadas con choque térmico, en distintas diluciones. Colonias totales: barra azul. Colonias con morfotipo de *Bt*: barra roja. ... 51
- Figura 12.** Aislamiento de colonias de *Bt* a partir de muestras de suelo en Zonas Intervenidas (ZI) y Zona No Intervenidas con actividad agrícola (ZNI). Barra azul: sin choque térmico. Barra roja: con choque térmico. 51

Figura 13. Micrografía óptica 1000X de un cultivo de *B. thuringiensis* en fase estacionaria de crecimiento. E: espora. C: cristal. G: esporangio. 52

Figura 14. Pruebas bioquímicas a las cepas presuntivas de *Bt*. A: Agar sangre. B: Agar LB-Estreptomicina. C: Agar LB- Penicilina. 53

Figura 15. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa 2% de los productos de PCR del gen *cry1*. PM: Marcador Peso Molecular 100 pb. C⁻: Control negativo (*Bacillus cereus*). C⁺: Control Positivo (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1). H₂O: Agua. Figura 13-A: Carriles 1 al 8: cepas 1 a la 8. Figura 13-B: Carriles 9-16: cepas 9 a la 16. 57

Figura 16. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de acrilamida 10% en condiciones desnaturizantes de las cepas de referencia. PM: Marcador de Peso Molecular (KDa). C⁺: Control positivo (*Btk*). C⁻: Control negativo (*Bc*). 59

Figura 17. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de acrilamida 10 % en condiciones desnaturizantes de las 16 cepas con posibilidades de *Btk*. PM: Marcador de peso Molecular (KDa). Figura 14-A: cepas 1, 2, 3, 12, 13, 16 y 4. Figura 14-B: cepas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 y 15. 60

Figura 18. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de acrilamida 10 % en condiciones desnaturizantes de las cepas 12 y 16. PM: Marcador de Peso Molecular (KDa). C⁺: Control positivo (*Btk*). A_(TCB): cepa 12 con Tampón Carbono Bicarbonato (TCB). B_(SDS): cepa 16 con Dodecilsulfato Sódico (SDS). 61

Figura 19. Alineamientos parciales de las secuencias del gen *cry1* reportadas con los cebadores propuestos por Bravo *et al.* (1998). A: región de hibridación para el cebador *gral-cry1* (f). B: región de hibridación para el cebador *gral-cry1* (r). Rojo: Sustituciones de nucleótidos en las secuencias con respecto al cebador. Azul: nucleótidos no conservados entre las secuencias. Negro: nucleótidos conservados. 63

Figura 20. Alineamientos parciales de las secuencias del gen *cry1* reportadas con los cebadores propuestos por Ben Dov *et al.* (1997). A: región de hibridación para el cebador *Uni1* (d). B: región de hibridación para el cebador *Uni1* (r). Rojo: Sustituciones de nucleótidos en las secuencias con respecto al cebador. Azul: nucleótidos no conservados entre las secuencias. Negro: nucleótidos conservados. 65

Figura 21. Micrografía óptica 1000X de la cepa 13 en fase estacionaria de crecimiento. E: espora. C: cristal. G: esporangio. 66

Figura 22. Micrografía óptica 1000X de la cepa 6 en fase estacionaria de crecimiento. G: esporangio. 67

Figura 23. Larva muerta de *Spodoptera frugiperda*, después de aplicado el tratamiento con la cepa 13. 72

Figura 24. Colonias con morfotipo característico de *Bt*, obtenidas del macerado de larva tratada con la cepa 13. 73

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo del título bacteriano	47
Ecuación 2. Análisis de mortalidad corregida	47

Para ti mami

AGRADECIMIENTO

Es complejo establecer un orden en estas líneas cuando sabes que, todos los que permitieron que este trabajo fuera posible, tienen el mismo nivel de importancia para mí. Comenzaré con el ente que aún sigo sin conseguir una definición propia, ¿por qué comenzar por este punto?, la respuesta es muy sencilla, porque ese ente que aún no logro definir forma parte de mí proceso creativo y de inspiración.

Seguidamente, quiero agradecer a mis padres, quienes con tanto esfuerzo, paciencia, amor, dedicación, optimismo, perseverancia, han hecho de mí lo que soy ahora, me han permitido ser y crecer como persona, me han dado la mejor de las oportunidades, y es formar parte de sus vidas. Gracias mami, por ser tan paciente y única. ¡Te amo!

A mis hermanos, que son mi fuente de inspiración, son mi columna vertebral. Me siento bendecida por tenerlos a mi lado. Son incondicionales, y mi principal ejemplo a seguir.

A ti Anibal, que has sido una bendición en mi vida, eres mi mejor amigo, mi mano derecha, el amor de mi vida, mi complemento, mi más fiel consejero. Te agradezco por ser incondicional, por tu sinceridad y tu paciencia. Cada día me maravillo más por tu fuerza espiritual, tu grandeza personal e intelectual, eres mi luz. Sobre todo, eres mi compañero de vida en esta realidad relativa, y espero que en muchas más. Te amo.

A mis amigos, Teresa De Lucca, Maryeling Grau, Andrecho Sequea, Johnnatan Loaiza, Nexander Betancourt, Roxybel Dulcey, que durante este arduo camino me han apoyado, aconsejado, ayudado, acompañado. Han sido elementales en mi vida, y estoy agradecida infinitamente por ser incondicionales.

A ti Karina Fernández, quiero agradecerte por ser una de mis mejores amigas, compañera, confidente y sobre todo por ser lo que realmente eres conmigo, única, maravillosa y especial.

A ti Jennyffer Del Nardo, que desde el momento en que nuestros caminos se unieron en esa librería, has sido incondicional, has estado siempre dispuesta a dar lo mejor de ti para ayudarme, te admiro, y te quiero profundamente. Estoy muy agradecida por nuestra amistad.

Por supuesto, no te iba a dejar fuera de la lista Lucia Sánchez, gracias por tu apoyo, por tu paciencia, por permitirme formar parte de tu familia, ¡Gracias! A ti Gaby, por tu esfuerzo en alimentarme cuando me encontraba en los momentos más fuertes de este proceso.

Gracias Prof. Roxana ha sido una fuente de inspiración en mi vida, gracias por permitirme formar parte de su vida, y por enriquecerme con su sabiduría en lo personal y en lo profesional. Fue como una mamá para nosotras. La admiro, y espero algún día llegar a ser tan grande como usted.

A ti Mariana Eleizalde, eres una de las personas más maravillosas que he conocido. El amor que sientes por lo que haces me inspiró mucho a seguir. Eres muy sabia en tu verbo, una gran persona, una gran amiga, tu incondicionalidad es uno de los tantos motivos por los que siento admiración por ti. Tus palabras eran justas y llegaban en el momento indicado, gracias por tu paciencia, esfuerzo y comprensión.

Gracias a ustedes chicas, Marubetsy Alcina e Irene Alvarado, somos un gran equipo, fueron incondicionales y grandes amigas, me siento feliz de que este laboratorio y este trabajo de tesis haya dado tantos frutos, uno de ellos es su grandiosa amistad. Las quiero chicas.

Gracias a la Universidad Central de Venezuela, por permitir mi desarrollo como científica. Gracias por mantenerte firme y fuerte, esta casa ha vencido la sombra de muchos gobiernos, y el

de éste no será la excepción. Gracias por ser un punto de inspiración para miles de jóvenes, y sobre todo, por crear libres pensadores.

Gracias al personal del Laboratorio de Procesos Fermentativos. En especial a Dayanara Navas, por cuidar de mis bebes durante todo este tiempo y por apoyarnos siempre. Al Prof. Blas Dorta (papá Blas) y a la Prof. Luisa Mejía.

También al profesor Jorge Pérez por los nuevos cebadores. A la profesora Alicia Cáceres y a Maoly Márquez por buscar mis muestras de suelo en Mérida.

Al Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos de la Universidad Simón Rodríguez, por permitirnos desarrollar parte de nuestro trabajo. A David Rosales, Marta Mendoza, Armando Reina, José Rubén Ramírez, Lucinda Tavares, Alpidio Boada, a todos ustedes gracias por su apoyo incondicional y por hacernos sentir en casa. En especial, al Prof. Luis Piñango, por ayudarnos en la búsqueda de las larvas.

Al Instituto de Medicina Tropical, en especial a Arturo Muñoz y a Eduardo Navarro, por el apoyo prestado, que fue de gran ayuda para poder culminar este trabajo.

También a Nailleth Méndez de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), por obsequiarme los cebadores, éstos fueron necesarios y fundamentales para la culminación de este trabajo.

A Leidy Cañizales y su familia, por abrirme las puertas de su casa y apoyarme en la búsqueda de larvas en los maizales.

A todos muchas gracias.

ABREVIATURA

- **ALP:** Fosfatasa Alcalina
- **APN:** Aminopeptidasa N
- **Bc:** *Bacillus cereus*
- **Bt:** *Bacillus thuringiensis*
- **Btk:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*
- **CVCM:** Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **H₂O_(d):** Agua destilada
- **IBE:** Instituto de Biología Experimental
- **IDEA:** Instituto de Estudios Avanzados
- **IDECYT:** Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos
- **INH:** Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel
- **KDa:** Kilodalton
- **LB:** Luria-Bertani
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **pb:** Pares de base
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **Pen^R:** Penicilina resistente
- **SDS:** Dodecilsulfato sódico
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- **Sf:** *Spodoptera frugiperda*
- **SS:** Solución Salina
- **Str^S:** Estreptomicina sensible
- **TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias
- **ZI:** Zonas intervenidas
- **ZNI:** Zonas no intervenidas

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es un microorganismo que constituye una alternativa ecológicamente sostenible a los insecticidas químicos, debido a la actividad tóxica sobre distintos tipos de invertebrados. En el mundo las investigaciones sobre *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se inician con la búsqueda de cepas que produzcan nuevas proteínas Cry que pudieran combatir diferentes plagas, de interés agrícola y de salud pública. Es por esto que en este trabajo el objetivo principal fue aislar y caracterizar cepas de *Bt* var. *kurstaki* (*Btk*) colectadas en suelos de alta montaña. Los aislados fueron caracterizados por métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares. En total se colectaron 11 aislados en zonas intervenidas con actividad agrícola (ZI) y 5 en zonas no intervenidas (ZNI), los cuales fueron identificados de acuerdo al fenotipo característico de *Bt*. De las cepas identificadas como *Bt*, sólo 6 de los 16 aislados presentaron el gen *cry1*. Paralelamente, se realizó el análisis de estos aislados en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), donde 9 de los 16 aislados evaluados presentaron la banda dominante de 140 KDa, característica de *Btk*. Los resultados obtenidos permitieron la identificación de 9 cepas de *Bacillus thuringiensis* en alta montaña. Posteriormente, se evaluó la actividad tóxica de dichos aislados de *Bt* mediante bioensayos con larvas de *Spodoptera frugiperda*, obteniendo que sólo 4 cepas mostraron una mortalidad mayor del 70 %. Esto constituye un aporte a la colección establecida en el Laboratorio de Procesos Fermentativos, cuyo propósito es desarrollar formulaciones comerciales de bioinsecticidas de producción nacional.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, PCR, *Spodoptera frugiperda*, bioinsecticida, *Btk*.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe una necesidad de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, en especial de insectos, alternativas a los productos químicos. Esto estimula considerablemente el interés en usar microorganismos entomopatógenos como agentes de biocontrol. El patógeno más exitoso en cumplir este objetivo, que además mantiene potencial para seguir desarrollándose, es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Sauka y Benintend, 2008).

B. thuringiensis pertenece a la familia *Bacillaceae* y se diferencia de las otras bacterias, del grupo *Bacillus cereus*, por la capacidad para formar, durante la fase de esporulación, una o más inclusiones cristalinas de naturaleza proteica, llamadas comúnmente δ -endotoxinas, que son tóxicas para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (Whiteley y Schnepf, 1986). Estas toxinas de naturaleza proteica están constituidas por proteínas Cry y Cyt de una o varias clases, las cuales le confieren un amplio y diverso espectro de acción insecticida (Porcar y Juárez-Pérez, 2004).

Este microorganismo es altamente ubicuo gracias a su capacidad de ocupar un gran número de ecosistemas terrestres. Sistemáticamente, ha sido asumido como un habitante del suelo gracias a la facilidad de ser aislado de este sustrato (Travers *et al.*, 1987). En los últimos años se ha establecido un importante número de colecciones de *Bt* en distintas partes del mundo, con la finalidad de encontrar cepas que produzcan nuevas proteínas Cry con mayor potencial insecticida. *Bacillus thuringiensis*, en especial la variedad *kurstaki* (*Btk*), está siendo utilizada actualmente como una alternativa ecológicamente sostenible a los

insecticidas químicos, para controlar plagas de lepidópteros en cultivos de interés agronómico (Whalon y Wingerd, 2003), como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), conocida comúnmente como “cogollero del maíz”. Esta polilla es plaga del maíz (*Zea mays* L.) y ataca este cultivo con niveles de densidad variables, disminuyendo su productividad.

- **Características generales de *Bacillus thuringiensis***

Bacillus thuringiensis es un bacilo Gram positivo, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho. Son móviles gracias a la presencia de flagelos, los cuales recubren casi o totalmente la superficie de la bacteria. El tamaño del genoma es de 2400 a 5700 kpb (Carlson *et al.*, 1994). Además, presenta la característica de desarrollar esporas elipsoidales de resistencia, que no provocan el hinchamiento ni la deformación del perfil bacilar (Gordon *et al.*, 1973). Esta bacteria es anaerobia facultativa, quimioorganótrofa y con actividad catalasa (Breed, 1986). Los distintos aislamientos de *Bt* presentan en general características bioquímicas comunes. Entre éstas, poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetilglucosamina. Sin embargo, su principal característica es la producción de una inclusión paraesporal (figura 1) formada por un cuerpo cristalino de naturaleza proteica durante el proceso de esporulación, que resultan tóxicas para distintos invertebrados al ser ingeridas por insectos susceptibles, entre los que se incluyen importantes plagas agrícolas, especialmente en sus estadios larvales (Macintosh *et al.*, 1990; Sauka y Benintende, 2008). Estos cristales paraesporales son detectables al microscopio óptico de contraste de fases y están básicamente conformados por una o varias toxinas llamadas δ -endotoxinas, que se

destacan por presentar actividad biocida contra una gran variedad de artrópodos, como lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros, homópteros, ácaros, entre otros, así como organismos de otros *phyla* como nematodos, trematodos y protozoarios (Feitelson, 1993).

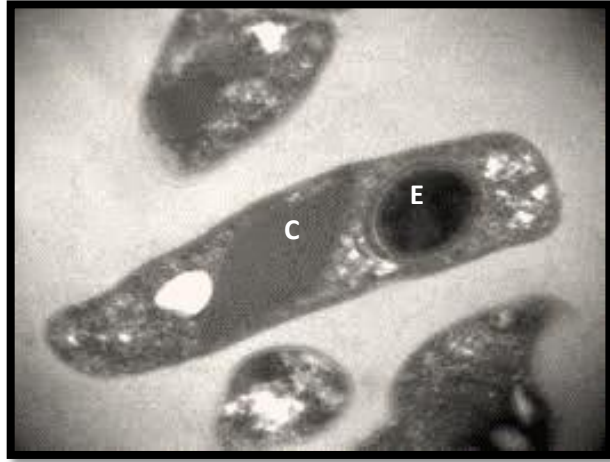


Figura 1. Micrografía de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en microscopio electrónico de transmisión. C: cristal proteínico bipiramidal. E: espora. Tomado de Torres *et al.* (2006).

La alta especificidad de las toxinas de *Bt* y su inocuidad para el medio ambiente, ha favorecido su desarrollo como bioinsecticida (Ruiz De Escudero *et al.*, 2004). Estas proteínas son una valiosa alternativa a los pesticidas químicos para el control de plagas de insectos agrícolas (Roh *et al.*, 2007).

- **Historia**

Durante muchos años la humanidad ha tenido la necesidad de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas. *Bt* es una de las bacterias más utilizadas con este propósito y su estudio se remonta a más de un siglo. En este sentido, Sansinenea (2012) propuso un orden cronológico descrito a continuación.

Bacillus thuringiensis fue descubierto por primera vez en el año 1901 en Japón, como el agente causal de la enfermedad en los gusanos de seda (*Bombyx mori*) (Ishiwata, 1901); nombrándolo Sottokin, que significa " bacilo de la muerte súbita", y describió la patología que provoca en las larvas del gusano de seda, así como las características del cultivo (Ishiwata, 1905). También describió en un reporte posterior, que la muerte de las larvas era causada por una toxina, que no dependía solamente de la ingesta del *Bacillus*.

En 1915, El bacteriólogo alemán Ernst Berliner, aisló el *Bacillus* de la polilla mediterránea de la harina (*Anagasta kuehniella*) y realizó la primera descripción formal, llamándola *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), nombre derivado de Thuringia, región de Alemania donde fue aislado. Ese mismo año, reportó la presencia de inclusiones paraesporales dentro de *Bt* (Berliner, 1915).

Posteriormente, Aoki y Chigasaki (1916) publicaron una descripción detallada del organismo de Ishiwata, al que llamaron *Bacillus sotto*, señalando que su actividad se debía a una toxina presente en los cultivos esporulados, pero no en cultivos de células vegetativas.

A pesar de lo poco que se entendía de la biología de este microorganismo en ese tiempo, se demostró ser altamente patogénico para las larvas de ciertas especies de plagas de lepidópteros. A finales de 1920, se inició el uso de *Bt* como pesticida en Hungría (Husz, 1928) y en Yugoslavia a principios de 1930, para controlar el taladrador de maíz europeo (Vouk y Klas, 1931).

El primer producto comercial, a base de formulaciones de esporas llamado Sporine, fue producido en 1938 por el Laboratorio Libec en Francia (Aronson *et al.*, 1986). Este producto

fue utilizado principalmente para matar polillas de la harina. Sin embargo, fue poco comercializado debido al inicio de la Segunda Guerra Mundial.

Los investigadores Angus (1954) y Hannay y Fitz-James (1955), encontraron que la principal actividad insecticida contra insectos lepidópteros (polilla) era debido a las proteínas de inclusión cristalinas formadas en el proceso de esporulación.

En los Estados Unidos de América, *Bt* fue usado comercialmente al inicio de 1958. En 1961, fue registrado como un pesticida por EPA (Environmental Protection Agency) y por otras compañías como: Merck, Agritrol, Rohm & Haas y Bakthane (Van der Laan, 1967; Van der Geest y Van der Laan, 1971).

En 1962, Eduard Kurstak aisló otra subespecie de *Bt*, obtenida de larvas enfermas de *A. kuehniella* de un molino de harina en Bures sur Yvette, cerca de París, Francia (Kurstak, 1962). Posteriormente, Dulmage (1970) reportó el aislamiento de una cepa de *Bt* proveniente de larvas enfermas de *Pectinophora gossypiella*, a este aislado lo llamó HD-1.

De Barjac y Lemille (1970), examinaron mediante serotipo flagelar los aislados de Kurstak y de Dulmage, encontrando que se trataba de una nueva subespecie de *Bt*, que denominaron *kurstaki*.

Ese mismo año, Laboratorios Abbott entró en el mercado con Dipel, que fue la primera preparación comercial basada en el nuevo aislado de *Bt* var. *kurstaki* (HD-1), el cual era usado para controlar plagas de lepidópteros, tales como la polilla de la col (*Trichoplusia ni*), gusano del maíz (*Helicoverpa zea*), gusano de las yemas del tabaco (*Heliothis virescens*) y plagas forestales como la polilla gitana (*Lymantria dispar*) y el gusano del abeto (*Choristoneura fumiferana*) (Dulmage, 1970).

Hasta 1976, sólo se habían descrito 13 cepas de *Bt*, las cuales eran tóxicas sólo a ciertas especies de larvas de lepidópteros. Ese mismo año, Goldberg y Margalit descubrieron una nueva cepa en el desierto de Negev de Israel, denominándola *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), altamente tóxica para larvas de diferentes especies de mosquitos (Goldberg y Margalit, 1977). Para 1992, compañías estadounidenses y europeas estaban produciendo y comercializando productos con *Bti* como Vectobac, Bactimos y Teknar para el uso contra larvas de dípteros.

En Alemania, Krieg *et al.* (1983) aislaron una cepa de *Bt* en gorgojos de *Tenebrio molitor*, siendo altamente tóxica para coleópteros, tanto en estadios larvales como adultos, denominándola *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*.

Para aumentar el catálogo de aislados de *Bt*, Martin y Travers (1989) obtuvieron más de 1000 aislados colectados en muestras de suelo de África, Asia, Europa, Norte y Sudamérica; de los cuales el 60 % fueron tóxicos para lepidópteros y dípteros.

De esta manera, durante muchos años *Bt* se ha convertido en una herramienta importante para el control de plagas. Hoy en día es el más exitoso insecticida microbiano comercial, que comprende aproximadamente el 90 % del mercado biopesticida.

- **Clasificación taxonómica**

El término “Grupo *Bacillus cereus*” es un término no taxonómico que se ha utilizado comúnmente para referirse a un grupo de bacterias cuya taxonomía ha sido ampliamente discutida (Vilas-Bôas *et al.*, 2007). Este grupo está compuesto por seis especies: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, y las más recientemente descritas *B. pseudomycoides* (Nakamura, 1998) y *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998). *Bacillus*

thuringiensis se encuentra estrechamente relacionada con *B. cereus* y *B. anthracis*, de los que no logra distinguirse por completo debido a que no existen suficientes diferencias en sus características morfológicas y bioquímicas (Schnepf *et al.*, 1998). Esta especie presenta un fenotipo característico en común con *Bacillus cereus*, eso incluye motilidad, requerimientos nutricionales, actividad hemolítica y resistencia a la penicilina (Vilas-Bôas *et al.*, 2007). A pesar de esto, el Manual de Bergey reconoce la individualidad de *Bt*, basándose sobre todo en dos características diferenciales: la presencia de la inclusión o cristal paraesporal y sus propiedades insecticidas (Sneath, 1986).

Para la clasificación de *Bt* se lleva a cabo la observación de la morfología del cristal a través de microscopio de contraste de fases. Además, se utilizan técnicas inmunológicas como la reacción en el serotipo H del antígeno flagelar (De Barjac y Bonnefoi, 1962), técnicas moleculares tal como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Porcar y Juárez-Pérez, 2003) y técnicas bioquímicas tales como la evaluación del patrón de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Bravo *et al.*, 1998) y crecimiento en medios selectivos (Porcar y Juárez-Pérez, 2004; Jensen *et al.*, 2003). Adicionalmente, se evalúan sus propiedades insecticidas a través de bioensayos (Martínez, 2004).

- **Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis***

El ciclo de vida de *Bt* se caracteriza por dos fases, que incluyen la división de la célula vegetativa y el desarrollo de esporas (Bulla *et al.*, 1980). La célula vegetativa tiene forma de bastón y se divide en dos células hijas uniformes por la formación de un tabique de división iniciado en la mitad de la membrana plasmática. La esporulación, por otro lado, implica la

división celular asimétrica y se caracteriza por siete etapas que incluyen la formación de filamento axial (etapa I), preespora y formación de tabique (etapa II), aparición de cristales parasporales y formación de la preespora (etapa III), formación de exosporium, pared celular primordial, corteza y abrigos de esporas acompañado de transformación del nucleóide y esporas (etapas IV a VI), y la maduración de las esporas y lisis del esporangio (etapa VII) (figura 2) (Bechtel y Bulla, 1982).

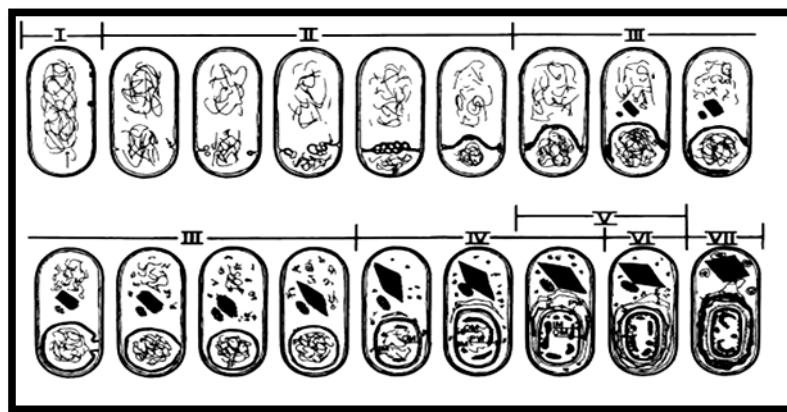


Figura 2. Diagrama de la esporulación en *B. thuringiensis*. (Bulla *et al.*, 1980). Tomado de <http://www.fao.org/docrep/t0533e/t0533e04.htm>

La esporulación es inducida por una disminución de los recursos nutritivos presentes en el medio. El proceso dura entre 6 a 8 horas y originan una serie de cambios morfológicos y fisiológicos remarcables (Errington, 1993). Las observaciones efectuadas en otros trabajos sobre el crecimiento y la naturaleza del cristal parasporal, mostraron que existe una relación entre la esporulación y la aparición de este cuerpo cristalino, el cual se compone principalmente de una o varias toxinas de naturaleza proteica llamadas comúnmente δ -endotoxinas (Porcar y Juárez-Pérez, 2004).

- **Características de las δ -endotoxinas**

Las δ -endotoxinas son el componente paraesporal predominante en la mayoría de subespecies de *Bt* (Bulla, 1980), donde existen variaciones en el número, la forma y la composición de estas inclusiones (Aronson *et al.*, 1986). Cada cuerpo de inclusión cristalino está constituido por proteínas Cry y Cyt (del inglés Crystal y Cytolytic, respectivamente) de una o varias clases, las cuales les confieren un amplio y diverso espectro de acción insecticida (Porcar y Juárez-Pérez, 2004). Ésta actividad biocida actúa sobre ciertas especies de insectos entre los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera durante el estadio larvario.

La definición de proteínas Cry es muy amplia, pero de manera general es una proteína paraesporal de 130 a 140 KDa, que muestra un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las actuales proteínas Cry. Por otra parte, las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de *Bt* que muestren actividad hemolítica o tengan similitud a la secuencia de las toxinas Cyt (Barloy *et al.*, 1996).

Las toxinas Cry y Cyt son proteínas globulares formadas por tres dominios estructurales discretos (figura 3). El dominio I está formado por siete estructuras α -hélice, donde una hélice central está rodeada de otras seis. Se ha propuesto que este dominio, participa en la formación de poros en la membrana de las células del intestino del insecto susceptible. El dominio II está formado por tres láminas de estructura β en antiparalelo. Este dominio participa en la interacción con el receptor, que se encuentra en la cara apical de la membrana epitelial del intestino medio del insecto blanco, determinando así la especificidad de la proteína. Finalmente, el dominio III es una estructura β - plegada que también parece estar

involucrada en especificidad y que participa en la protección contra proteasas (Bravo y Cerón, 2004).

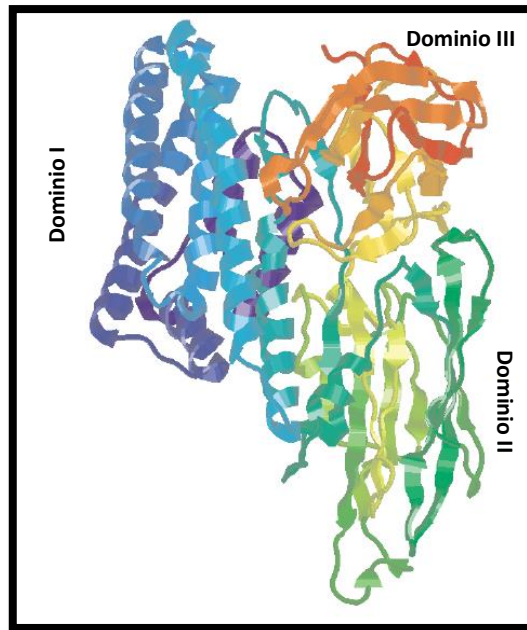


Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína insecticida Cry1Aa producida por *Bacillus thuringiensis*. Tomado de De Maagd *et al.* (2001)

Hasta el 2015, han sido descritas 305 proteínas, clasificadas en 74 grupos de diferentes clases y subclases, las cuales están reportadas en la base de datos de Crickmore (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

La familia de genes que codifican para estas toxinas es la familia del gen *cry* (Crickmore *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998). Una característica común de los genes *cry* es su expresión durante la fase estacionaria de crecimiento. La gran mayoría de los genes *cry* que se conocen pertenecen al grupo *cry1* y estos son sin duda los más estudiados. (Crickmore *et al.*, 2008 [en línea]).

- **Características generales de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***

Se han realizado múltiples estudios del cristal y sus proteínas. Se logró en muchos casos establecer asociaciones entre su morfología, sus proteínas Cry constituyentes, el peso molecular de éstas y su espectro de actividad insecticida para caracterizar nuevos aislados (López-Meza e Ibarra, 1996). Una de las cepas más utilizada a nivel comercial para el control de plagas es *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*), ésta puede crecer en suelos húmedos, con nutrientes derivados de la descomposición de plantas y en tejidos infectados de insectos (Ghassemi *et al.*, 1981). Esta variedad, que en las formulaciones comerciales se conoce como *Btk*-HD1, es ampliamente utilizada para el control biológico de insectos lepidópteros, que constituyen plagas agrícolas, forestales y de salud pública (Gajardo *et al.*, 2012). Esta es una de las cepas de *Bt* mejor estudiadas y se caracteriza principalmente por la portación de los siguientes genes *cry* antilepidópteros: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2A* y en algunos *cry1Ia* (Höfte y Whiteley, 1989; Sauka, 2007).

Los cristales de *Bt*, en general, pueden presentar distintas morfologías, pudiendo ser bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (Khetan, 2001). Particularmente, *Btk* se caracteriza por presentar un cristal con morfología bipiramidal (figura 4) (Arango *et al.*, 2002).

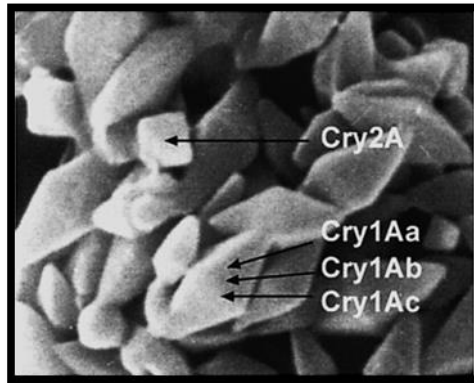


Figura 4. Micrografía de la inclusión cristalina de *Btk*, señalando la composición de proteínas Cry asociadas a la estructura bipiramidal del cristal paraesporal. Tomado de:
<http://wwnorton.com/college/biology/micrograph/single.aspx?fig=222>

- **Características generales de *Spodoptera frugiperda***

Spodoptera frugiperda (*Sf*) es un insecto del orden Lepidóptera, perteneciente a la familia Noctuidae, siendo conocido comúnmente como “cogollero del maíz”. Esta polilla es una de las principales plagas en sembradíos de maíz (*Zea mays*), donde se alimenta de las hojas y los tallos tiernos (Marengo *et al.*, 1992; Kumar y Mihm, 2002).

Este lepidóptero presenta dimorfismo sexual (figura 5), donde cada hembra ovipone un promedio de 100 a 150 huevos en cada postura. Los huevos son de forma globosa de 0,5 mm de diámetro, con estrías radiales, de color rosado pálido (Morales y Negrete, 2003). Después de 3 a 5 días de incubación las larvas emergen del huevo, su cuerpo es blanquecino vidrioso, pero la cabeza y el dorso del primer segmento torácico es negro intenso (Gutiérrez, 1984). El período larval dura un promedio de 25 días, pasando generalmente por seis o siete estadíos (Artigas, 1994; Murúa *et al.*, 2003; Murúa y Virla, 2004; Murúa *et al.*, 2008). El término estadío se usa para indicar el periodo entre mudas durante el desarrollo (Curtis *et al.*, 2008).

A partir del tercer estadio se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones en las superficies foliares que son apreciados cuando la hoja se abre o desenvuelve (Morales y Negrete, 2003).

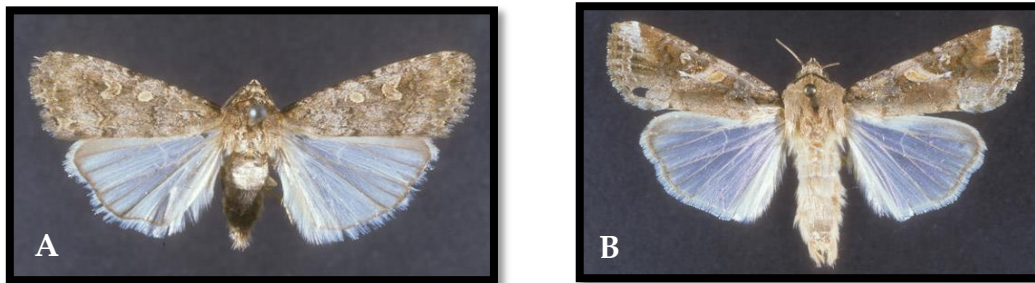


Figura 5. Dimorfismo sexual en *Spodoptera frugiperda*. A: hembra. B: macho. Tomado de: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm

Para completar su desarrollo, la larva consume un promedio total de 179,7 cm² de superficie foliar de hojas de maíz, dejando de alimentarse justo antes de alcanzar el último estadio (Rezende *et al.*, 1994). Al alcanzar un tamaño aproximado de 20 a 25 mm pasan al estadio de pupa, para ello se entierran en el suelo, entre 3 y 5 cm de profundidad, donde forman una cámara pupal, en la cual permanecen por 10 días aproximadamente, para posteriormente emerger como adultos. El ciclo completo dura aproximadamente entre 35 y 40 días, dependiendo de la temperatura y humedad (figura 6) (Artigas, 1994; Valverde *et al.*, 1995; Murúa *et al.*, 2003; Murúa y Virla, 2004).

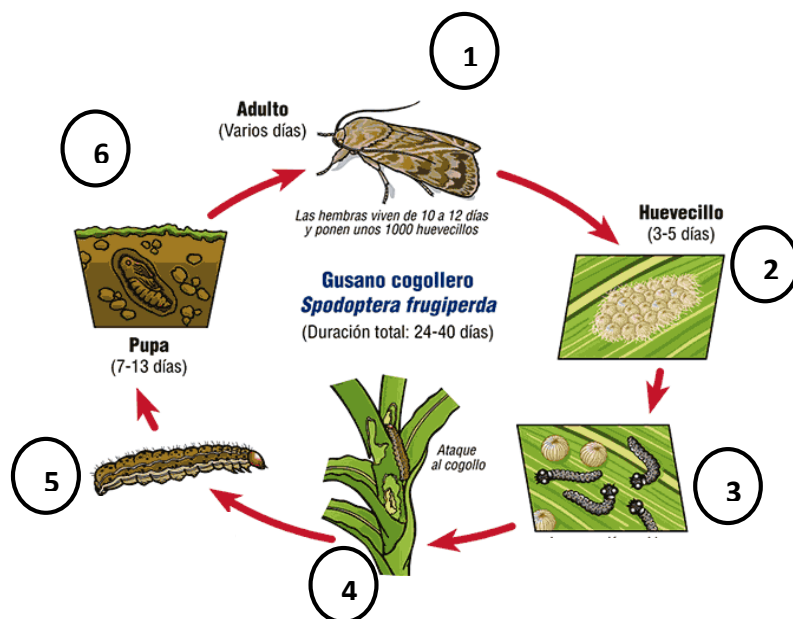


Figura 6. Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*. 1: *Sf* estado adulto. 2: Ovoposición. 3: Eclosión. 4: Larva alimentándose de superficie foliar. 5: último estadio larval. 6: Formación de cámara pupal. Tomado de: <http://www.bayercropscience.com.mx/>

S. frugiperda es un insecto polífago que ataca principalmente los cultivos de maíz, disminuyendo la productividad de los mismos y en consecuencia ocasiona numerosas pérdidas económicas en la industria agrícola. Adicionalmente, debido a su poder de aclimatación a diferentes condiciones, se ve favorecida su amplia distribución geográfica (Casmuz *et al.*, 2010).

- ***Spodoptera frugiperda* y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***

Durante muchos años, para reducir los efectos nocivos del cogollero del maíz y otras plagas de cultivo, se ha dependido del uso de insecticidas químicos inorgánicos y orgánicos. Ciertas propiedades hacen estos productos químicos útiles, como la acción residual a largo plazo y grado de toxicidad para un amplio espectro de organismos. Sin embargo, la aplicación de éstos ha causado muchos problemas ambientales, incluyendo la resistencia a

insectos, la toxicidad para los humanos y para los insectos parasitoides (Glazer y Nikaido, 1995). Es por esto que se han propuesto y aplicado los insecticidas microbianos como sustitutos de los productos químicos (Raymond *et al.*, 2010).

El patógeno de insectos más utilizado para el control de plagas de *S. frugiperda*, es *Btk*, ya que sus toxinas son activas contra los estadios larvales de *Sf*, principalmente cuando se encuentran en el tercer instar. El mecanismo de acción de las proteínas Cry es característico en todas las cepas de *Bt*. El complejo espora-cristal es ingerido, y posteriormente el cristal es solubilizado 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 (Bravo *et al.*, 2004). Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrofica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial del intestino medio de la larva (figura 7). (Bravo *et al.*, 2004; Griko *et al.*, 2007).

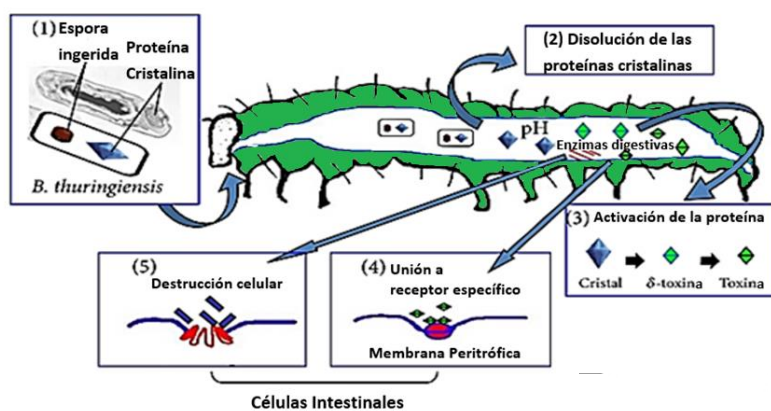


Figura 7. Modo de acción de *Bt* en una larva de Lepidóptera. 1: ingestión del complejo. 2: solubilización de los cristales. 3: activación de la toxina. 4: unión a la proteína receptora. 5: formación del poro y lisis celular. Tomado de: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/135675/fig2/>

Posteriormente, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, inicia una cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006). Además, el inicio de esa cascada de señalización estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula, aumentando el número de receptores; por ende, recluta un número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial (Zhang *et al.*, 2008).

Por otro lado, con base en experimentos *in vitro* y bioensayos, se propuso que la unión de los monómeros a caderina facilita el rompimiento proteolítico sobre el extremo N-terminal de la toxina (Gómez *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007). Este último corte, induce el ensamble de los monómeros y se establece una forma oligomérica llamada pre-poro. Esta estructura incrementa la afinidad por un receptor secundario como puede ser la aminopeptidasa N (APN) o la fosfatasa alcalina (ALP) (Bravo *et al.*, 2004; Jurat y Adang, 2004). Finalmente, la unión a ese segundo receptor facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio, lo que provoca un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular (figura 8) (Bravo *et al.*, 2004). El tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva, llevando a la muerte del insecto. Los síntomas que se observan son el cese de la ingesta, parálisis del insecto, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Aronson *et al.*, 1986; Gupta *et al.*, 1985), la cual puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele (De Maagd *et al.*, 2001; Schnepf *et al.*, 1998).

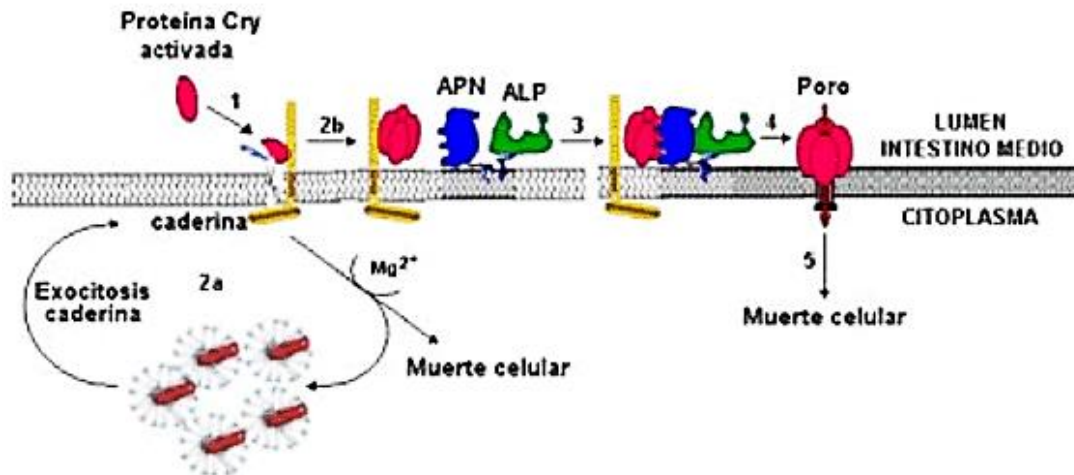


Figura 8. Mecanismo de acción de proteínas Cry en insectos lepidópteros. 1: Unión de la toxina a caderina. 2a: inicio de la cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} . 2b: formación del pre-poro. 3: unión del oligómero a la APN y/o ALP. 4: formación del poro. 5: desequilibrio osmótico y muerte celular (Adaptado de Bravo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Tomado de (Sauka y Benintende, 2008).

Tomando en cuenta que se conoce el mecanismo de acción de *Btk* sobre *Sf* y el importante rol de la proteínas Cry en este proceso, las investigaciones se han destinado a establecer un número importante de colecciones de *Bt* con la finalidad de encontrar cepas que produzcan nuevas proteínas Cry con mayor potencial insecticida (Whalon y Wingerd, 2003).

- **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*” (Sauka y Benintende, 2008). El primer informe de una planta transgénica con un gen *cry* de *B. thuringiensis* data de 1987 (Vaeck *et al.*, 1987). 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* (Sauka y Benintende, 2008).

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 (Sauka y Benintende, 2008).

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 (Khetan, 2001; Hossain *et al.*, 2004).

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 (González-Cabrera, 2001).

ANTECEDENTES

El uso de agentes microbianos como biocontroladores ha sido considerado como una alternativa ecológica a los agroquímicos. *Bacillus thuringiensis* es una de las cepas más utilizadas como componente principal de formulaciones comerciales para el control de plagas. Existe un interés creciente, en laboratorios del mundo, en la búsqueda de nuevas cepas que produzcan nuevas proteínas Cry, con un mayor espectro de actividad biocida, las cuales puedan ser utilizadas para la realización de nuevas formulaciones. La gran mayoría de estas investigaciones inician con la búsqueda de muestras de suelo, ya que son la fuente más importante de *Bt*.

Bacillus thuringiensis fue asumida como un habitante del suelo gracias a Martin y Travers (1989), quienes tomaron muestras de suelos en más de 30 países distribuidos en los 5 continentes. Como resultado lograron crear una colección que contaba con más de 1115 aislados de *Bt* en Estados Unidos y 25 aislados en otras ciudades del mundo, reportando diferentes subespecies basándose en la morfología del cristal.

Por otro lado, Bernhard *et al.* (1998) colectaron 5003 aislados de *Bt* en 80 países, la mayoría de las muestras provenían del Reino Unido y Norte América, donde solo el 5 % de los aislados obtenidos eran de Suramérica.

En investigaciones llevadas a cabo en Latinoamérica, Ibarra *et al.* (2003) probaron una colección de 6531 cepas de *Bt* obtenida de muestras de suelo de Brasil, México y Colombia. Estos aislados fueron enfrentados a larvas de *Aedes aegypti*, encontrando que 1881 presentaban actividad tóxica contra las larvas de este insecto.

Por su parte, en investigaciones acerca de la ecología de *Bt*, se ha establecido que la presencia de este microorganismo en el medio ambiente se ve favorecida por la abundancia de los insectos. Se ha propuesto que las especies de insectos y las especies de *Bt* han coevolucionado (Feitelson *et al.*, 1992). Bravo *et al.* (1998), partiendo de esta suposición y considerando que México es un país con una gran biodiversidad, se propusieron como objetivo establecer una colección nativa de *Bt* de ese país, suponiendo que con estas colecciones de cepas autóctonas podrían obtener nuevas proteínas Cry, que pudieran ser utilizadas como controladores para distintas plagas. En esta investigación se colectaron 503 muestras de suelo en 5 macroregiones del país, obteniendo como resultado 496 aislados de *Bt*. Éstos fueron analizados mediante PCR multiplex con cebadores generales y específicos para detectar un amplio espectro de genes *cry*. De esta forma, el gen *cry1* era el más abundante en los aislados (49,5 %), seguido del gen *cry3* (21,5 %). Sin embargo, un 14 % de las muestras analizadas no generaron producto de PCR, proponiendo que estos aislados pueden presentar nuevos genes *cry*.

Monnerat *et al.* (2001), proveen un catálogo que contiene 1400 aislados de *Bt* entomopatogénicos, pertenecientes a Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología. Estos aislados fueron obtenidos de muestras de suelo y de agua en diferentes lugares de Brasil. En investigaciones posteriores se probó la actividad tóxica de esta colección sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* y *Anticarsia gemmatalis* (Monnerat *et al.*, 2007).

Asimismo, en 2003, Uribe *et al.* colectaron muestras de suelo tanto en áreas agrícolas como silvestres, en diferentes regiones de Colombia. Estos investigadores destacan que de las áreas intervenidas con actividad agrícola se encontraban cultivos de papa; uno de los más

importantes en ese país, los cuales no habían sido asperjados con ninguna formulación comercial de *Bt*. Mientras que las áreas silvestres, donde se colectaron las muestras, correspondían a bosques tropicales y sabanas. Estos investigadores reportaron como nativos los 108 aislados de *Bt* obtenidos, a los cuales se les realizó una caracterización a nivel bioquímico y molecular, observando que la mayoría poseían el gen *cry1*. Adicionalmente, se les evaluó su actividad tóxica sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Premnotrypes vorax* (Coleoptero plaga de la papa), encontrando que presentaban una alta patogenicidad.

En Venezuela, Vitelli *et al.* (2010) procesaron muestras de suelos obtenidas en la Península de Paria (0 m.s.n.m), donde no había sido asperjado ningún bioinsecticida con base en *Bt*. De este análisis, se identificaron 11 cepas nativas de *Bt* caracterizadas molecularmente, a través de la técnica de ribotipificación automatizada. La categorización en ribogrupos demostró una gran variabilidad entre los aislados.

Chak *et al.* (1994), realizaron un estudio en Taiwán con 225 cepas de *Bt* aisladas tanto en zonas de gran altura (3000 m.s.n.m.) como en zonas de baja altitud (varios cientos de metros sobre el nivel del mar), evidenciando que la distribución de los genes *cry* de sus aislados depende de la región geográfica. En esta investigación se observó que el gen *cry1* se encontraba en mayores proporciones en zonas de alta montaña (> 3000 m.s.n.ms.).

Como se puede observar, existen muchos reportes que dan cuenta de la importancia del establecimiento de colecciones de *Bt*, que pudieran proporcionar nuevas proteína Cry que sean tóxicas para plaga de interés agrícola como de salud pública.

JUSTIFICACIÓN

El uso de agroquímicos ha traído como consecuencia la contaminación de suelos y cuerpos de agua en donde se han aplicado. También, estos insecticidas químicos son una fuente contaminante de alimentos y constituyen un riesgo para la salud del operador que los asperja, sin contar con que promueve la resistencia de las plagas y además afecta a insectos que no son blancos dentro del programa de control. Por esta razón, el uso de bioinsecticidas ha sido una alternativa ecológicamente viable, ya que son específicos sobre la plaga e inocuos sobre otros animales y el hombre. Entre los controladores microbianos más usados se encuentran los bioinsecticidas con base en virus, hongos y bacterias, entre ellas *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

Los productos bioinsecticidas hechos con base en *Bt*, han sido ampliamente utilizados para el control de plagas de lepidópteros durante los últimos 40 años (Navon, 2000), tiempo durante el cual se ha establecido un importante número de colecciones en distintas partes del mundo, con la finalidad de encontrar cepas que produzcan nuevas proteínas Cry, con mayor potencial insecticida o un espectro de hospedadores más amplio que los actualmente conocidos (Ruiz De Escudero *et al.*, 2004).

Bacillus thuringiensis es una bacteria ubicua, ha sido aislada en distintos tipos de sustratos y de varios ambientes. Aunque, Dulmage y Aizawa (1982) sugirieron que el suelo es el hábitat común de este microorganismo. Del mismo modo, Martin y Travers (1989) reportaron que *Bt* se encontraba en mayor proporción en suelos de alta montaña. Mientras que Chak *et al.* (1994) indican que las cepas aisladas en suelos de altas montañas (≥ 3000

m.s.n.m.) presentan una mayor producción de proteínas Cry1, que los aislados obtenidos en menores altitudes.

En el Laboratorio de Procesos Fermentativos, se han llevado a cabo investigaciones concernientes a la búsqueda de nuevas cepas de *Bt* que pudieran ser consideradas en un programa de producción de bioinsecticida a escala industrial. Todas las cepas que reposan en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) fueron colectadas en zonas a 0 m.s.n.m. en la Península de Paria. Sin embargo, existen investigaciones que proponen que se pueden aislar mayor cantidad de muestras de *Bt* en suelos de alta montaña que en suelos de menor altitud (Martin y Travers, 1989; Chak *et al.*, 1994).

Es por ello, que este estudio se basa en la obtención de nuevas cepas nativas de *Bt*, en muestras de suelo colectadas en zonas de alta montaña (≥ 3300 m.s.n.m.) de la comunidad de Gavidia, Edo. Mérida. Con el propósito de evaluar la patogenicidad de estos aislados, se realizaron bioensayos sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*. De esta manera, se hace un aporte a la colección establecida en el CVCM, con el propósito de ampliar el banco de cepas, que en un futuro puedan ser usadas para crear formulaciones comerciales de bioinsecticidas de producción nacional.

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

- Aislar y caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) de muestras de suelo obtenidas en Gavidia, Edo. Mérida.

- **Objetivos específicos**

- Aislar selectivamente cepas de *Bt* a partir de muestras de suelo encontrados en zonas intervenidas y no intervenidas con actividad agrícola en Gavidia, Edo. Mérida.
- Caracterizar molecularmente los aislados de *Bt* a través de la identificación de genes *cry1* que solo están presentes en las cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.
- Demostrar la efectividad de las toxinas de *Btk* sobre *Spodoptera frugiperda* a través de bioensayos.

MATERIALES

- **Material biológico**

- **Cepas bacterianas**

- *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, obtenido en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, bajo la denominación CVCM 1819, que corresponde a la cepa HD-1 obtenida de Dipel ® de Bayer.
 - *Bacillus cereus* obtenido en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, bajo la denominación CVCM 1832.
 - Cepas *B. thuringiensis* aisladas a partir de muestras de suelo (con y sin intervención de actividad agrícola) colectadas en la población de Gavidia, Municipio Rangel, Edo. Mérida, Venezuela (70°54'48" N, 8°40'02"), a una altitud de 3363 m.s.n.m., temperatura anual promedio de 8,4 °C, con una vegetación de tipo rosetal-arbustal, característico de la formación Páramo Andino (Monasterio, 1980).

En la tabla 1 se muestran las coordenadas geográficas donde se colectaron las muestras de suelo, las cuales fueron analizadas en el Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología Experimental (IBE).

Tabla 1. Coordenadas de la recolección de las muestras de suelo en la población de Gavidia- Edo. Mérida.

Actividad agrícola	Muestra de suelo	m.s.n.m	Coordenadas
Zonas Intervenidas	M24	3386	08° 40' 01.8" N, 70° 54' 48.9" O
	M25	3396	08° 40' 04" N, 70° 54' 50.7" O
	M26	3025	08° 39' 60" N, 70° 54' 43.1" O
	M9	3380	08° 40' 13.1" N, 70° 54' 31.4" O
	M10	3383	08° 40' 12.9" N, 70° 55' 03.9" O
	M11	3321	08° 40' 31.1" N, 70° 55' 20.7" O
Zonas no intervenidas	M12	3576	08°47'55.8"N, 70°49'33.6"O
	M5	3566	08° 47' 58.7" N, 70° 49' 30.1" O
	M6	3576	08° 47' 54.8" N, 70° 49' 36" O
	M7	3539	08° 39' 42.3" N, 70° 54' 23.5" O
	M8	3541	08° 39' 42.6" N, 70° 54' 23.3" O
	M13	3441	08° 39' 47.2" N, 70° 54' 32" O
	M14	3436	08° 39' 49" N, 70° 54' 32.1" O
	M15	3436	08° 39' 49" N, 70° 54' 32.1" O
	M1	4172	08° 51' 29.1" N, 70° 49' 28.4" O
	M2	4171	08° 51' 29.7" N, 70° 49' 27.7" O
	M3	4200	08° 51' 37" N, 70° 49' 40.9" O
	M4	4223	08° 51' 46.5" N, 70° 49' 58" O
	M16 - M21	3362	8° 40' 04" N, 70° 54' 37" O
	M22; M23; M27-M29;M31	3446	8° 39' 55" N, 70° 54' 39" O
	M30; M32-M36	3465	8° 39' 52" N, 70° 54' 41" O

○ **Larvas de *Spodoptera frugiperda***

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* fueron colectadas en la ciudad de Villa de Cura, Municipio Zamora, Edo. Aragua, Venezuela. Estas fueron criadas en el Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología Experimental (IBE). La cría fue mantenida con dieta artificial y fotoperiodos de 10 horas de luz y 14 horas de sombra.

- **Medio de cultivo para larvas de *Spodoptera frugiperda***

La dieta de mantenimiento para las larvas de *S. frugiperda* es con base a caraotas blancas, la composición de la dieta se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Composición para 250 g de dieta de mantenimiento para larvas de *S. frugiperda*.

Ingredientes	Cantidad (g)
Caraota blanca	100
Levadura granulada	15
Metilo4- Hidroxibenzoato	1,25
Ácido Sórbico	1,25
Agar	7,5
Agua	250 mL

A los 100 g de caraotas blancas se le agregaron los 125 mL de H₂O_(d), este paso se recomienda hacerlo 1 día antes de la preparación de la dieta con el fin de permitir que las caraotas estén más blandas al momento de la preparación. Por otro lado, se tomó 125 mL de agua y se agregó el agar. Las caraotas y el agar se llevaron a autoclavar a 15 lb por 15 min. Al sacarlo del autoclave, se vertieron las caraotas y el medio en una licuadora y se agregaron los demás ingredientes. Se colocó en un envase plástico hasta que bajara la temperatura y se refrigeró.

- **Medios de cultivos para el crecimiento de las cepas bacterianas**

- **Medio de cultivo de referencia**

- **Medio A-80:** Este medio propuesto por Arcas *et al.* (1984), se utilizó para la obtención del complejo spora-cristal de la cepa *Bt* de referencia (tabla 3).

Tabla 3. Composición de las soluciones del medio A-80.

Solución	Reactivos	Cantidad (g)
A 1200 mL H ₂ O _(d)	Extracto de levadura	6
	KH ₂ PO ₄	1,5
	K ₂ HPO ₄	1,5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
B 150 mL H ₂ O _(d)	MgSO ₄ 7H ₂ O	1,5
	MnSO ₄ H ₂ O	0,045
	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,06
C 150 mL H ₂ O _(d)	Glucosa	12

La solución A y la solución B se esterizaron a 15 lb durante 15 min a 121 °C. La solución C se esterilizó a 10 lb por 15 min. Estas cantidades corresponden a 1,5 L de medio A-80. Las soluciones B y C se agregaron a la solución A, la solución B se agregó gota a gota para evitar la precipitación de las sales.

▪ **Agar Luria-Bertani (Agar LB):** Este medio se utilizó para el crecimiento de las cepas de *Bacillus thuringiensis*, obtenidas de la siembra de las diluciones seriadas de las muestras de suelo, con y sin tratamiento térmico. A continuación en la tabla 4 se muestran los compuestos.

Tabla 4. Composición del medio Luria-Bertani para 1 L de medio.

Compuestos	Cantidad (g)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Agar	15

Al agregar los compuestos, se colocó el recipiente en agitación y calentamiento, con el fin de disolverlos. Se esterilizó por 15 min a 15 lb y 121 °C. El agar se sirvió en placas de Petri en condiciones de esterilidad.

- **Agar Nutritivo (AN):** Este medio se utilizó para la preservación, en punciones, de las cepas de *Bt* aislada. Para 1 L de solución se agregaron 22,5 g de Agar Nutritivo en 1 L de agua destilada. Se preparó en una fiola en agitación y calentamiento. Posteriormente, se agregaron 5 mL del medio en viales de vidrio, se esterizaron a 15 lb por 15 min.

- **Medios de cultivos selectivos para el crecimiento y aislamiento de cepas de *Bt* presente en muestras de suelo.**

- **LB-Estreptomicina (50 mg/L):** La solución madre de estreptomicina se preparó a una concentración de 10 mg/mL a partir de un formulado comercial. Esta solución fue filtrada con filtros MFS 25 cuyo poro es de 0,45 µm de diámetro. Se tomaron 0,5 mL de la solución madre y se añadieron a 100 mL de agar LB. El antibiótico se agregó después de esterilizar el agar y cuando se encontraba a 50 °C, esto se realizó en condiciones de esterilidad.

- **LB-Penicilina (100 mg/L):** La solución madre de estreptomicina se preparó a 10 mg/mL a partir de un formulado comercial. Esta solución fue filtrada con filtros MFS 25 cuyo poro es de 0,45 µm de diámetro. Se tomó 1 mL de la solución madre y se añadieron a 100 mL de agar LB. El antibiótico se agregó después de esterilizar el agar y cuando se encontraba a 50 °C, esto se realizó en condiciones de esterilidad.

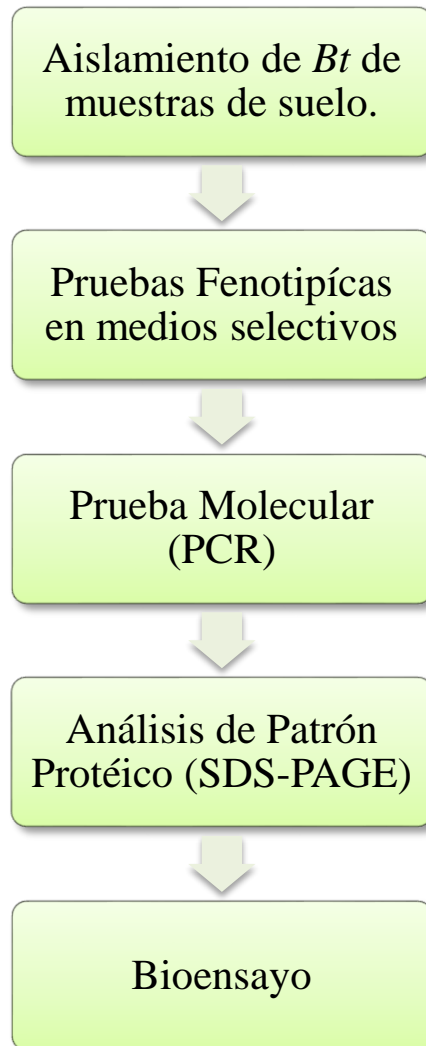
- **Agar sangre al 10 %:** Para preparar 1 L de agar sangre, se pesaron 42,5 g de medio base Columbia, cuya composición se describe en la tabla 5 y se agregó a 1 L de H₂O_(d).

Tabla 5. Composición del Medio Base Columbia.

Compuestos	Cantidades (g)
Peptona	23
Almidón	1
NaCl	5
Agar	10

Se esterilizó por 15 min a 15 lb y 121 °C. Se dejó reposar el medio hasta que se encontrara a 50 °C, se agregaron 10 mL de sangre de carnero obtenida en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INH). Posteriormente, se sirvió el medio constituido en placas de Petri, esto se realizó en condiciones de esterilidad.

PLAN DE TRABAJO



METODOLOGÍA

- **Aislamiento de cepas bacterianas *Bt* a partir de muestras de suelo.**
 - **Recolección y procesamiento de las muestras de suelo.**

Para la recolección de las muestras de suelo en zonas de alta montaña (≥ 3300 m.s.n.m), de la comunidad de Gavidia–Edo. Mérida, en terrenos con y sin intervención de actividad agrícola, se descartó la capa superficial del suelo, sin superar los 5 cm de profundidad, se tomó la muestra bajo condiciones estériles, colocándola en frascos plásticos estériles. Las muestras colectadas, se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1985) descrito a continuación.

Las muestras se desecaron en estufa a 60 °C por 2 h, luego se homogenizaron en un mortero estéril. De cada muestra se tomó 1 g de suelo y se añadió a 10 mL de agua destilada estéril. Se colocó en agitación durante 1 min. Se tomó 1 mL y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril. De la suspensión se tomaron alícuotas de 10 μ L y 15 μ L, las cuales se aforaron a 200 μ L y 1000 μ L, respectivamente. Luego, las diluciones se sometieron a pasteurización en un baño a 80 °C durante 10 min, seguido de 5 min de enfriamiento en hielo. De estas diluciones se tomaron 0,1 mL, se sembraron en placas con agar LB (antes y después del choque térmico) y se incubaron durante 24 h a 30 °C, lo que permitió el crecimiento de las colonias aisladas.

El control positivo *Btk* (CVCM 1819) y el control negativo *Bacillus cereus* (CVCM 1832) se sembraron en agar LB por agotamiento.

- **Aislamiento de colonias con morfotipo de *Bt*.**

Una vez transcurridas las 24 h de la incubación de las placas con los aislados de las muestras de suelo, se procedió a seleccionar aquellas colonias individuales que poseían el morfotipo característico de *B. thuringiensis*, es decir, aquellas colonias blancas, grumosas, con bordes irregulares, con aspecto ceroso. Luego, las colonias fueron repicadas en Agar LB, se incubaron por 72 h a 30 °C, para la posterior observación del complejo espora-cristal a través de un microscopio de contraste de fases.

- **Observación de cristales en microscopio óptico.**

Una vez transcurridas las 72 h de incubación, las colonias aisladas se sometieron a observación en microscopio de contraste de fases, marca Nikon, modelo 116437, con aumento de 1000X (por inmersión) para verificar si presentaban la formación del complejo espora-cristal. Para ello, utilizando un asa se tomó una porción de una colonia aislada y se colocó sobre un portaobjeto con una gota de glicerina al 100 %, para evitar la movilidad de las células. Las colonias típicas de *Bt* presentan esporangios alargados donde se encuentra el complejo espora cristal.

- **Medios de cultivos selectivos.**

Se seleccionaron las colonias que presentaban el morfotipo de *B. thuringiensis* y la producción del complejo espora-cristal. Estos aislados se sembraron en placas con Agar LB-Penicilina (100 mg/L), Agar LB-Estreptomicina (50 mg/L) y Agar Sangre al 10 %. *Bt* se caracteriza por presentar un fenotipo Pen^R, Str^S y hemólisis⁺. Este tipo de prueba permitió una mejor selección de los aislados presuntivos para *Bt* después de la selección con choque térmico.

- **Cultivo y mantenimiento de cepas bacterianas.**

Cada una de los aislados obtenidos, que haya pasado la prueba de los medios selectivos, fue conservada en viales de vidrio con medio de Agar Nutritivo. Para ello, se tomó una colonia con un asa estéril y se realizaron punciones en el Agar Nutritivo contenido en el vial. Los tubos fueron sellados con parafina para evitar contaminaciones. Se guardaron a 4 °C.

- **Caracterización molecular de los aislados bacterianos.**

Estos procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Parasitología, ubicado en el Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT) de la Universidad Simón Rodríguez.

- **Identificación de genes cry.**

El método que se utilizó para el análisis de la presencia de los genes que codifican para la síntesis de las toxinas Cry1 de *Btk* fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) descrito por Bravo *et al.* (1998).

- **Extracción de DNA de las cepas de *Bt*.**

El DNA total fue extraído de cada uno de los aislados que presentaban el fenotipo característico de *Bt* (Pen^R, Str^S y hemólisis⁺). La técnica de extracción se basó en la propuesta por Bravo *et al.* (1998). Sin embargo, se realizaron algunas modificaciones al protocolo. Se tomaron 5 mL de caldo LB y se inocularon con las cepas de *Bt*, dejándolo en agitación toda la noche a 30 °C. De ese cultivo se tomó 1 mL y se colocó en un Eppendorf de 1,5 mL estériles. Se centrifugó en una microcentrifuga a 11.000 x g por 2 min. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 100 µL de agua miliQ estéril. Las muestras

se sometieron a 5 rondas consecutivas de choques térmicos de 45 min a -140 °C en vapores de Nitrógeno y luego 2 min en baño de María a 100 °C. Se colocaron las muestras en la microcentrífuga a 9000 x g por 1 min. Se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril.

- **Cuantificación del DNA.**

Una vez finalizado el proceso de extracción de DNA, se procedió a su cuantificación. Ésta fue realizada en el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Mediante el uso de un NanodropTM, utilizando 2 µL de la muestra para su análisis.

- **Condiciones de la PCR.**

La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2400. La mezcla de reacción, con un volumen final de 25 µL, contenía 2,5 µL de cada par de oligonucleótidos (5 µM), 12,5 µL de Polimerasa Master Mix (concentración final: 2,5 mM MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,2 mM de dNTP's) y 250 ng de DNA templado, aforado con H₂O libre de nucleasas estéril.

Para la identificación de los genes *cry1* en los aislados, se usaron un par de iniciadores generales Gral-*cry1*, descritos por Bravo *et al.* (1998) en las siguientes condiciones:

Un ciclo de desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos programados (cada uno de: 95 °C por 1 min para el segundo paso de desnaturalización, 53 °C por 1 min para el acoplamiento de los iniciadores y un ciclo de extensión de 1 min a 72 °C). Y un paso extra

de extensión a 72 °C durante 10 min. Los oligonucleótidos que se utilizaron se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos que se utilizaron como iniciadores para la determinación de los genes *cry1* en la reacción de PCR, según Bravo *et al.* (1998).

Gen	Nombre del iniciador	Secuencias
<i>cry1</i>	Gral-cry1 (f)	5'-CTGGATTTACAGGTGGGGATAT-3'
	Gral-cry1 (r)	5'-TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT-3'

- Preparación del Gel.

Para el análisis de los fragmento de PCR se utilizó una cámara de electroforesis horizontal con gel de agarosa preparado a una concentración de 2 %, en amortiguador TAE 1X. Se le agregaron 4 µL de Syber Safe al gel como agente intercalante.

En cada pozo se depositaron 12 µL de producto PCR de los Controles positivos y negativos (C⁺ y C⁻) con 2 µL de Buffer de carga, y 25 µL de producto PCR de las muestras con 4 µL de Buffer de carga, se realizó la corrida electroforética a 100 V durante 40 min. También se cargaron, en uno de los bolsillos, 4 µL de marcador de peso molecular de 100 pb, marca Gibco BRL. Finalizado el tiempo de corrida, el producto de PCR se observó en un sistema de documentación de geles marca UVISAVE. El tamaño de los productos de PCR que se obtienen es de 558pb.

- **Análisis del patrón de proteína del producto del gen *cry1*.**

Este análisis se realizó con la finalidad de evidenciar la banda dominante de 140 KDa, característica de la proteína Cry1.

- **Obtención del complejo espora-cristal.**

Una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, se realizaron tres procedimientos distintos para la obtención del complejo espora cristal, para su posterior análisis en gel de acrilamida.

▪ **Primer procedimiento:** Este se aplicó a todas las muestras, fue propuesto por Bravo *et al.* (1998). Se realizó un cultivo con las cepas aisladas en 5 mL de medio A-80, se dejó en agitación por 72 h a 30 °C. Se centrifugó a 11000 x g, luego se le agregó buffer Laemmli 2X en una relación 1:1, se colocó en baño de María a 100 °C, por 10 min. Posteriormente se sembró en gel de acrilamida.

▪ **Segundo procedimiento:** Este se realizó para la cepa 16, la cual se cultivó en 15 mL de medio A-80, en agitación por 72 h a 30 °C. Luego, se procedió a medir la Densidad Óptica (DO) a 600 nm, se tomaron 1500 µL de cultivo y se centrifugaron a 12300 x g por 2 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 68 µL de H₂O destilada estéril y 68 µL de buffer Laemmli 2X, de esta manera se aumentó la concentración de los cristales paraesporales en la solución. Posteriormente, se procedió a sonicar en hielo a 3 pulsos de 10 seg c/u, con una amplitud del 100 %, el sonicador utilizado fue el Sonics Vibra Cells VCX-130. Seguidamente se le agregó SDS al 20 % en una relación 1:4. Se agitó por 30 seg y se colocó en baño de María a 100 °C por 10 min, seguido de una agitación nuevamente por 30 seg. Posteriormente, se sembró en gel de acrilamida.

▪ **Tercer procedimiento:** Este procedimiento se realizó para la cepa 12, fue propuesto por Bravo y Cerón (2004), al cual se le realizó ciertas modificaciones. Se cultivó dicha cepa en 5 mL de medio A-80, se dejó en agitación toda la noche a 30 °C. Posteriormente, se

inocularon 20 mL de Medio A-80 con el preinóculo de 5 mL. Se dejó en agitación por 72 h a 30 °C. Se tomaron 10 mL de cultivo, se centrifugaron a 3000 x g por 10 min, se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 0,75 mL de Tampón Carbono Bicarbonato (TCB) 1X, se agitó por 1 min. Se le agregó β -mercaptoetanol al 5 %. Se incubó por 2 h a 37 °C, luego se agitó vigorosamente por 1 min. Posteriormente, se sonicó en hielo, aplicando 3 pulsos de 10 seg c/u con una amplitud del 100 %. Se agitó por 1 min nuevamente, luego se centrifugó en la microcentrifuga a 12300 x g por 2 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con 50 μ L de agua destilada, de esa suspensión se tomaron 20 μ L y se diluyeron en 200 μ L. A esta última dilución, se le agregó buffer Laemmli 2X en una relación 1:4, es decir, 55 μ L Buffer de carga. La muestra se incubó en baño de María a 100 °C por 10 min para activar la actividad del β -mercaptoetanol. Posteriormente, esta muestra fue utilizada para la electroforesis en gel de poliacrilamida.

- **Electroforesis en geles de poliacrilamida.**

La separación de las proteínas que componen el cristal de cada una de los aislados se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), esta técnica fue propuesta por Laemmli (1970), la cual permite separar las proteínas de acuerdo a su tamaño.

▪ **Gel de resolución al 10 %:** Se prepararon 10 mL de este gel (tabla 7). Se mezcló $H_2O_{(d)}$, solución de poliacrilamida al 30 %, buffer Tris-base 1,5 M a pH 8,8, SDS (Dodecilsulfato Sódico) al 10 %, APS (Persulfato de Amonio) al 10 % y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina).

Tabla 7. Composición del gel de acrilamida.

Compuestos	Gel de resolución 10 % (mL)	Gel apilamiento 5 % (mL)
Agua destilada	4	2,1
acrilamida 30%	3,3	0,5
Buffer Tris-base 1,5 M	2,5 (pH 8,8)	0,38 (pH 6,8)
Dodecilsulfato Sódico (SDS) 10 %	0,1	0,03
Persulfato de Amonio (APS) 10 %	0,1	0,03
N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED)	0,004	0,003
Volumen final	10	3

Para la electroforesis se utilizó una minicámara BIO-RAD modelo Mini-PROTEAN® 3 Cell. Para la realización del gel SDS-PAGE se ensamblaron los vidrios donde se polimerizó el gel, el vidrio espaciador presentaba un espesor de 0,75 mm. Una vez ensamblados, se procedió a mezclar los componentes del gel de resolución (tabla 7), el TEMED fue el último compuesto agregado, ya que la polimerización inicia una vez es añadido. Posteriormente, se vació en el espacio entre las placas de vidrio, dejando un espacio aproximado de 1 cm del borde para agregar el gel de apilamiento. Se dejó en posición vertical, y utilizando una piseta se agregó etanol al 70 % para homogenizar y eliminar burbujas del borde del gel.

Una vez polimerizado el gel (30 min), se eliminó el etanol de la superficie, y se lavó con agua destilada para remover acrilamida no polimerizada, luego se eliminó la mayor cantidad posible de agua con ayuda de papel absorbente. Posteriormente, se procedió a preparar el gel de apilamiento (tabla 7), siguiendo el mismo protocolo de preparación del gel de resolución.

▪ **Gel de apilamiento al 5 %:** Se prepararon 3 mL de este gel. Se mezcló H₂O_(d), solución de poliacrilamida al 30 %, buffer Tris-base 1,5 M a pH 6,8, SDS (Dodecilsulfato Sódico) al

10 %, APS (Persulfato de Amonio) al 10 % y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina).

Una vez agregado el TEMED, se tomó la mezcla con una pipeta de 5 mL y se vació el contenido en la superficie del gel de resolución, insertando inmediata y cuidadosamente el peine de teflón limpio en el gel de apilamiento, evitando la formación de burbujas de aire. El gel se dejó en posición vertical a temperatura ambiente por 30 min.

Una vez completada la polimerización se removió el peine de teflón cuidadosamente, se lavó superficialmente con agua destilada para remover residuos de acrilamida. El gel se colocó en la cámara de electroforesis, se le agregó buffer de corrida Tris-Glicina 1X (tabla 8).

▪ **Buffer de corrida Tris-glicina 1X:** Se preparó 1 L de buffer. Se mezcló Tris base 0,05 M, glicina 0,38 M y SDS 0,1 %.

Tabla 8. Composición de buffer de corrida Tris-Glicina.

Composición	Cantidad (g)
Tris base (0,05 M)	6,05
Glicina (0,38 M)	28
SDS (0,1%)	1

Este buffer se agregó a la cámara interna hasta llegar al borde de los vidrios, cuidando de que no se formaran burbujas de aire entre las placas de vidrio en el fondo del gel. Luego, a la cámara externa se le agregó dicho buffer hasta llenar un poco más de 2 cm el mini tanque.

Una vez armada completamente la cámara, se procedió a cargar las muestras, las cuales fueron mezcladas con buffer de carga Laemmli 2X: Tris-HCl 25 mM (pH: 6,8), β -mercaptoetanol 1,28 M, azul de bromo fenol 2,89 mM, SDS 0,138 M y glicerol 2,17 M.

Las muestras fueron cargadas en los bolsillos del gel de apilamiento utilizando una Micro Jeringas Hamilton de 25 μ L (\pm 1 % volumen nominal). Se colocó un rango de 4 a 12 μ L de muestra (previamente procesadas para la obtención del complejo espora-cristal) en el fondo de cada pozo. El marcador de peso molecular utilizado fue de la Marca Gibco BRL BenchMark, n° de catálogo 10748-010.

Se procedió a conectar la cámara electroforética a una fuente de poder, se aplicaron 100 V, 33 mA por 1 h y 30 min. Al finalizar la electroforesis, los vidrios que contenía el gel, fueron removidos de la cámara, luego se procedió a separar el vidrio corto del vidrio espaciador, al ubicar el gel se procedió a separar el gel de apilamiento del gel de resolución, luego este se marcó haciendo un corte en sus esquinas para poder reconocer la orientación del mismo. Posteriormente, se tomó el gel y se sumergió en la solución de tinción de proteínas (tabla 9) durante 1 h en agitación continua.

Tabla 9. Composición de solución de tinción de proteínas (100 mL).

Compuestos	Concentración % v/v
Azul de Coomassie	250 mg
Etanol	45 mL
Ácido acético	9 mL
Agua destilada	46 mL

Posteriormente, se tomó el gel y se sumergió en solución decolorante (tabla 10) durante 1 h en agitación continua.

Tabla 10. Composición de la solución para decoloración del gel de poliacrilamidas (400 mL).

Compuestos	Cantidades (mL)
Metanol 100%	180
Ácido acético 100%	40
Agua destilada	180

Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió al registro de la imagen, utilizando una mesa de transiluminación BIO-RAD, fotografiando con el sistema de documentación de geles UVISAVE.

- **Análisis *in silico* del cebador.**

Adicionalmente se realizó un análisis con herramientas de bioinformática para corroborar si las regiones del gen *cry1* donde se acoplan los cebadores, realizados por Bravo *et al.* (1998), son altamente conservadas. Para ellos se utilizó el programa MultAlin (Multiple sequence alignment by Florence Corpet) el cual se encuentra en la web (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Este programa reconoce secuencias nucleotídicas en formato FASTA. Dichas secuencias fueron tomadas de NCBI (National Center for Biotechnology Information) [en línea].

Cada uno de los aislados fue comparado con las cepas de referencia por medio de su patrón de proteínas. Se realizó un cultivo de cada uno de los aislados, utilizando el medio de referencia A-80 (tabla 3), se cultivó por 72 h a 30 °C.

- **Bioensayos**

Con el propósito de evaluar la actividad tóxica de los aislados bacterianos, se realizaron bioensayos en el Laboratorio de Procesos Fermentativos del IBE con larvas sanas de *Spodoptera frugiperda*. Para ello, realizaron los procedimientos descritos a continuación:

- **Cultivo en Batch.**

Para la realización del bioensayo, se procedió a realizar cultivos en batch de las cepas que presentaban el patrón de proteína y producto PCR característicos de *Btk*. El medio utilizado para crecer las cepas fue el A-80.

En condiciones de esterilidad, se tomó una punción de las cepas de *Btk* y se inocularon en un tubo de ensayo que contenía 15 mL de medio A-80 para preparar el preinóculo, se incubó toda la noche a 30 °C con agitación. Luego, se inocularon 135 mL de medio A-80 y con los 15 mL preinóculo. El cultivo se colocó en agitación continua durante 72 h a 30 °C.

- **Titulación bacteriana.**

Con la finalidad de estimar la cantidad del complejo espora-cristal que se le agregó a cada tratamiento se realizó una titulación del cultivo. Al transcurrir 72 h del cultivo en batch, se tomó una alícuota de 1 ml de cada cultivo y se realizaron diluciones seriadas 10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-5} y 10^{-6} . De estas dos últimas diluciones, se sembraron 0,1 mL en placas de Agar LB. Posteriormente, se sometieron a pasteurización en un baño de María a 80 °C durante 10 min, seguido de 5 min de enfriamiento en hielo. Se tomó una alícuota de 0,1 mL de ambas diluciones y se sembraron en placas de Agar LB. Las placas se incubaron a 30 °C y transcurrida 24 h se realizaron las respectivas titulaciones.

Por otro lado, al sacar las alícuotas del cultivo se realizaron análisis al microscopio para la observación del complejo espora-cristal.

- **Obtención del complejo espora-cristal.**

Paralelamente a la titulación bacteriana, se realizó la obtención del complejo espora cristal de las cepas a evaluar. Los cultivos en batch realizados, Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo ubicado en el IBE, para la extracción del complejo mediante la centrifuga marca Sorvall. En unos tubos Corex de 30 mL se colocaron 25 mL de cultivo, se centrifugaron a 10000 x g por 15 min, se descartó sobrenadante y se realizó un lavado con Solución Salina (SS) 1 M, luego se agregaron otros 25 mL de cultivo y nuevamente se centrifugó bajo las condiciones ya descritas, se descartó sobrenadante y se realizó nuevamente un lavado con SS 1 M. El volumen final de centrifugado fue de 50 mL. Se descartó la SS del centrifugado y se agregaron 2 mL de SS 1 M. Posteriormente, se refrigeró a -20 °C para su posterior uso.

Una vez transcurridas las 24 h de incubación de las placas de titulación, se contó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cada placa. Posteriormente, se calculó el título bacteriano (ecuación 1) de las placas con choque térmico, ya que se estima que la relación espora-cristal es 1:1, y en las placas con choque térmico sólo se observa crecimiento de colonias provenientes de esporas, ya que el tratamiento térmico elimina las células en estado vegetativo. Con esto se puede estimar la cantidad de cristales que se agregó por cada mL de tratamiento.

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo del título bacteriano

$$\text{Título bacteriano} = \left(\frac{\text{UFC} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de siembra}} \times \text{Volumen de cultivo centrifugado} \right) / \text{volumen SS 1 M}$$

○ **Montaje del bioensayo.**

Para el bioensayo, se usaron 25 larvas sanas de *Spodoptera frugiperda* por tratamiento. Una vez obtenido el título bacteriano, se procedió a realizar una dilución 1/2 de cada cepa con Tween 80 al 0,01 %. Para cada larva, se pesaron aproximadamente 0,3 g de la dieta artificial, y se le agregaron 0,1 mL de tratamiento. Luego el alimento con el inóculo se introdujeron en un recipiente de plástico estéril, junto con la larva. Una vez consumido el alimento tratado, se colocaron trozos de dieta del mismo tamaño sin el tratamiento dentro de cada recipiente. Se evaluó la mortalidad acumulada de los individuos bajo los tratamientos durante 5 días consecutivos, utilizando la cepa *Btk* de referencia como control positivo, H₂O_(d) estéril + Tween 80 sin tratamiento y H₂O_(d) estéril como control negativo.

Posteriormente, los valores de mortalidad acumulada se evaluaron mediante la ecuación de mortalidad corregida (ecuación 2) propuesta por Abbott (1925), para identificar que la muerte fue ocasionada por el tratamiento y no por otras causas.

Ecuación 2. Análisis de mortalidad corregida

$$Pt = \frac{(Po - Pc)}{100 - Pc} \times 100$$

Donde:

Pt= Mortalidad total

Po= Mortalidad Observada

Pc= Mortalidad del control

Una vez corregido el porcentaje de mortalidad acumulada se realizó una evaluación a través de una prueba de análisis de la varianza de un factor (ANOVA, de 95% de confianza). Seguidamente, se realizó una prueba a *posteriori* de diferencias mínima significativa de Fisher (DMS con significancia de 0,05) donde se determinó la diferencia significativa entre los tratamientos.

- **Evaluación post mortem de las larvas de *Spodoptera frugiperda*.**

Una vez aplicado el tratamiento con los aislados de *Bt*, se procedió a evaluar aquellas larvas que murieron durante el bioensayo. Esto se realizó con el propósito de verificar la presencia de las cepas, utilizadas en el tratamiento, en el interior del insecto. Para ello, se tomó una larva por cada tratamiento y se procedió a desinfectar el exterior de la misma, utilizando hipoclorito de sodio al 3 %. Posteriormente, estas larvas fueron sumergidas sucesivamente en tres envases con agua destilada estéril, con el propósito de eliminar el exceso de hipoclorito de sodio.

Seguidamente, se colocaron en un tubo de ensayo estéril con un 1 mL de agua destilada estéril, se procedió a macerarlas para liberar su contenido al medio. Una vez maceradas, se sembró por agotamiento en placas de Agar LB-Penicilina por 24 h a 30 °C.

RESULTADOS

En la comunidad de Gavidia, Edo. Mérida, se colectó un total de 36 muestras de suelo, donde 6 de éstas corresponden a zonas con intervención agrícola y las 30 restantes corresponden a zonas sin intervención agrícola. A partir de estas muestras de suelo se obtuvieron los aislados de interés.

- **Aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis* de muestras de suelo obtenidas en alta montaña**

La siembra de las muestras de suelo arrojó un total de 1149 colonias, de las cuales 36 presentaron el morfotipo de *Bt*: bordes irregulares, aspecto ceroso y poroso y de color blanco (figura 9).

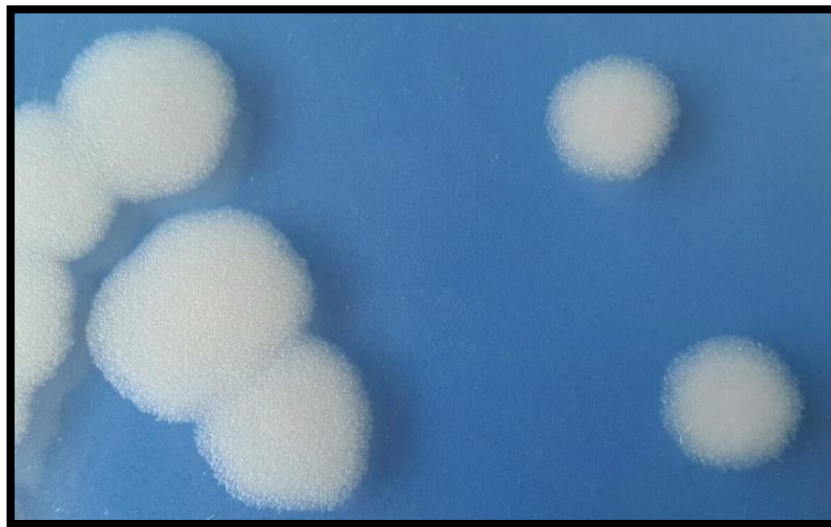


Figura 9. Colonias aisladas con morfotipo característico de *Bt*.

En la figura 10 se muestra el número de colonias totales con respecto a las colonias presuntivas de *Bt*.

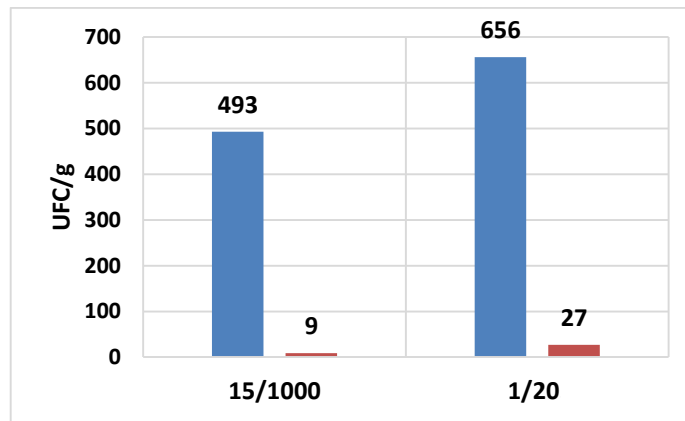


Figura 10. Aislamiento de colonias de *Bt* a partir de muestras de suelo en distintas diluciones sin tratamiento con calor. Colonias totales: barra azul. Colonias con morfotipo de *Bt*: barra roja.

En la figura 10 se presentan las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de muestras de suelo. Para el procesamiento de las muestras se realizaron dos diluciones, 15/1000 y 1/20. En la dilución 15/1000 se obtuvieron 493 colonias de las cuales 9 presentaron el morfotipo de *Bt*. Mientras que en la dilución 1/20 se obtuvo un número mayor de colonias (656) de las cuales 27 presentaron las características de *Bt*.

Mediante el procedimiento reportado por la Organización Mundial de la Salud (1985) para el aislamiento de aquellas cepas esporulantes, al aplicar un tratamiento con calor, se lograron aislar 887 colonias de las cuales 21 UFC presentaron el morfotipo ya descrito de *Bt* (figura 11).

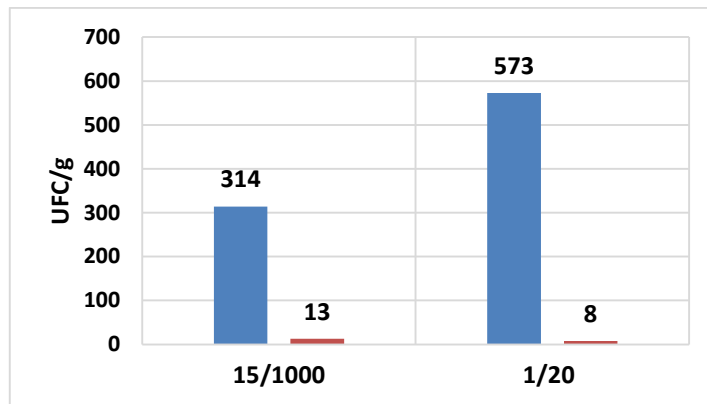


Figura 11. Aislamiento de colonias de *Bt* a partir de muestras de suelo tratadas con choque térmico, en distintas diluciones. Colonias totales: barra azul. Colonias con morfotipo de *Bt*: barra roja.

En la figura 11 se observa que al aplicar el choque térmico, las muestras que fueron diluidas 15/1000 presentaron un total de 314 colonias, de las cuales 13 mostraron el morfotipo característico de *Bt*. Al diluir la muestras de suelo 1/20, se obtuvo un total de 573 UFC, donde 8 presentaron dicho morfotipo. De esta manera, el número de colonias totales resultantes de ambas diluciones fue de 887, y al aplicar choque térmico 21 UFC correspondieron al morfotipo de *Bt*.

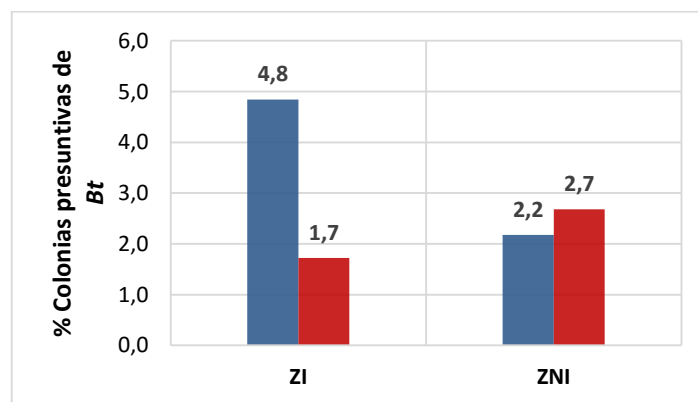


Figura 12. Aislamiento de colonias de *Bt* a partir de muestras de suelo en Zonas Intervenido (ZI) y Zona No Intervenido con actividad agrícola (ZNI). Barra azul: sin choque térmico. Barra roja: con choque térmico.

En la figura 12 se muestra la procedencia de las colonias que posiblemente pertenecían a *Bt*. De las muestras colectadas en Zonas Intervenidas (ZI) se aisló el 4,8 % de colonias (20 UFC) sin aplicar tratamiento térmico y 1,7 % (5 UFC) al aplicarlo. En cuanto a las Zonas No Intervenidas con actividad agrícola (ZNI), se obtuvo el 2,2 % de colonias con posibilidades de *Bt*, correspondiente a 16 UFC, sin aplicar tratamiento calórico, y por otro lado, 2,7 % de esporas resistentes al calor (16 UFC).

Seguidamente, las cepas con factibilidad de *Bt* fueron evaluadas a través de un microscopio óptico para corroborar si presentaban la inclusión cristalina.

- **Observación de inclusiones cristalinas en *Bt***

Al visualizar a través del microscopio óptico los 57 cultivos, incubados por 72 h, sólo 20 presentaron el complejo espora-cristal, donde 14 correspondieron a ZI y 6 a ZNI (figura 13).



Figura 13. Micrografía óptica 1000X de un cultivo de *B. thuringiensis* en fase estacionaria de crecimiento. E: espora. C: cristal. G: esporangio.

En la figura 13 se muestra la micrografía de uno de los 20 cultivos que presentaron el complejo espora-cristal. Se observaron esporangios en forma bacilar, que contenían la espora refringente, que no deforma su perfil, y el cuerpo cristalino opaco. También se observaron esporas libres en el medio y detrito celular. Por otro lado, la visualización de la forma del cristal no fue posible en todas las muestras. A las cepas que presentaron el complejo espora-cristal se les realizaron pruebas bioquímicas para su identificación.

- **Identificación bioquímica de los aislados**

Las 20 cepas que presentaron el complejo espora-cristal, se sembraron en medio selectivo para corroborar el fenotipo característico de *B. thuringiensis*, el cual es Pen^R, Str^S y hemólisis⁺ (figura 14).

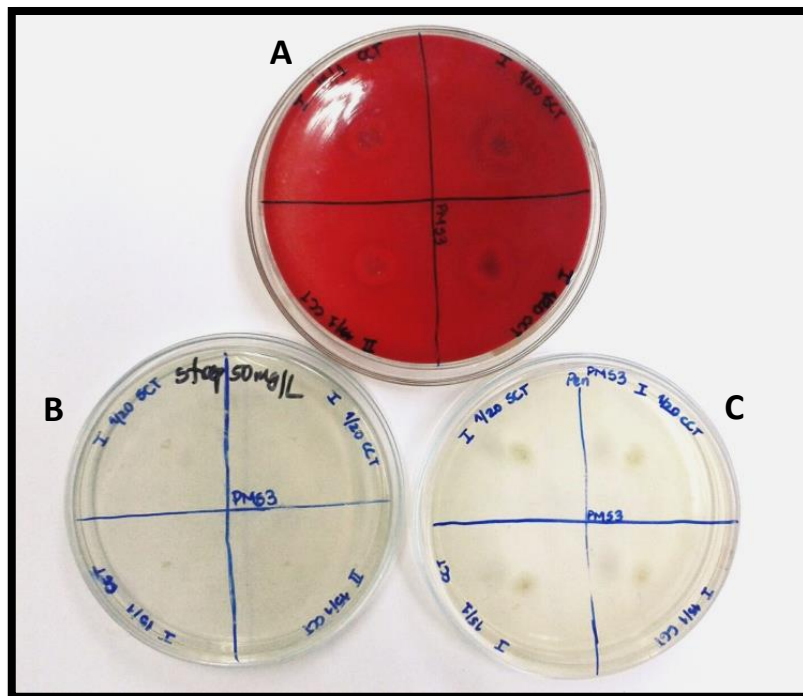


Figura 14. Pruebas bioquímicas a las cepas presuntivas de *Bt*. A: Agar sangre. B: Agar LB-Estreptomicina. C: Agar LB- Penicilina.

En la figura 14 se observan 3 placas dividida en 4 secciones. En cada cuadrante se encuentra una de las cepas aisladas, dando un total de 4 cepas distintas analizadas en los 3 medios selectivos. En la figura 14-A se muestra el Agar Sangre, donde se visualizó la hemólisis alrededor de las cuatro colonias. Asimismo, en la figura 14-B se encuentra la placa con el Agar LB-Estreptomicina, donde no se visualizó el crecimiento de colonias en ningún cuadrante. Por último, en la figura 14-C se muestra la placa con Agar LB-Penicilina, donde se observó el crecimiento de las referidas colonias. De esta manera, las cuatro cepas analizadas presentaron el fenotipo de *Bt*, estos resultados se obtuvieron para 16 de las 20 cepas evaluadas.

En la tabla 11 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en el aislamiento de las cepas a partir de las muestras de suelo.

Tabla 11. Cepas de *Bacillus thuringiensis* resultantes luego del tratamiento térmico, visualización en microscopio y pruebas bioquímicas.

Actividad agrícola	Muestra de suelo	Colonias aislada (morfotipo de la colonia)	Complejo Esp/Cri	Fenotipo Hem ⁺ , Str ^S y Pen ^R (Nº colonias)
Zonas Intervenidas	M9	4	+	4
	M10	6	+	3
	M11	4	+	4
Zonas No Intervenidas	M6	1	+	0
	M12	1	+	1
	M15	1	+	1
	M23	1	+	1
	M28	1	+	1
	M31	1	+	1
Total cepas		20		16

+: Presencia. -: Ausencia

En la tabla 11 se especifican los resultados de todas las pruebas realizadas a las muestras de suelo. En la primera columna se indica la procedencia de las muestras, Zonas Intervenidas y Zonas No intervenidas con actividad agrícola. Luego, en la segunda columna se encuentran las 9 muestras de suelo de donde se obtuvieron las colonias con el morfotipo de *Bt*. Seguidamente, en la tercera columna, se muestra el número de colonias presuntivas para *Bt* según su morfología. De estas 20 colonias se hizo la observación del complejo espora-cristal, indicando con un signo “+” la presencia del cristal. Finalmente, en la quinta columna se muestra el número de colonias que presentaron el fenotipo característico de *B. thuringiensis*, dando un total de 16 colonias.

Después de analizar las pruebas fenotípicas se procedió a la realización de las pruebas moleculares para determinar la presencia del gen *cry1*.

- **Caracterización molecular de las cepas bacterianas aisladas**

Para poder identificar las cepas durante la caracterización molecular, se asignó un número a las 16 colonias analizadas (tabla 12).

Tabla 12. Número asignado a las cepas con fenotipo característico de *Bt*.

Actividad agrícola	Muestras de suelo	Colonias con fenotipo de <i>Bt</i>	Número asignado a cada colonia
Zonas Intervenidas	M9	4	1-4
	M10	3	5-7
	M11	4	8-11
Zonas No Intervenidas	M12	1	12
	M15	1	13
	M23	1	14
	M28	1	15
	M31	1	16

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en las cepas aisladas**

La caracterización molecular de las cepas se realizó mediante la técnica de PCR propuesta por Bravo *et al.* (1998). Inicialmente, se procedió a cuantificar la cantidad de DNA extraído de las 16 cepas. Los resultados se muestran en la tabla 13, donde se evidencia la cantidad y calidad de los DNA.

Tabla 13. Cuantificación de DNA de cepas aisladas de *Bt.*

Cepas	Ácidos nucleico (ng/μL)	Absorbancia (260/280)
1	737.63	2,02
2	830.35	2,07
3	956.39	2,00
4	226.57	1,44
5	278.91	1,66
6	520.56	1,68
7	579.99	1,82
8	996.62	2,15
9	1124.81	2,09
10	897.50	1,93
11	916.65	2,00
12	1001.70	1,71
13	844.86	2,03
14	545.52	1,66
15	628.62	1,79
16	1102.50	1,91
17 (C+)	1109.32	1,88
18 (C-)	541.27	1,83

C+: control positivo; C-: control negativo

Una vez cuantificados los DNA de las muestras, se procedió a realizar la PCR. En la figura 15 se muestra el resultado de los productos PCR a través de geles de agarosa al 2 % de las 16 cepas.

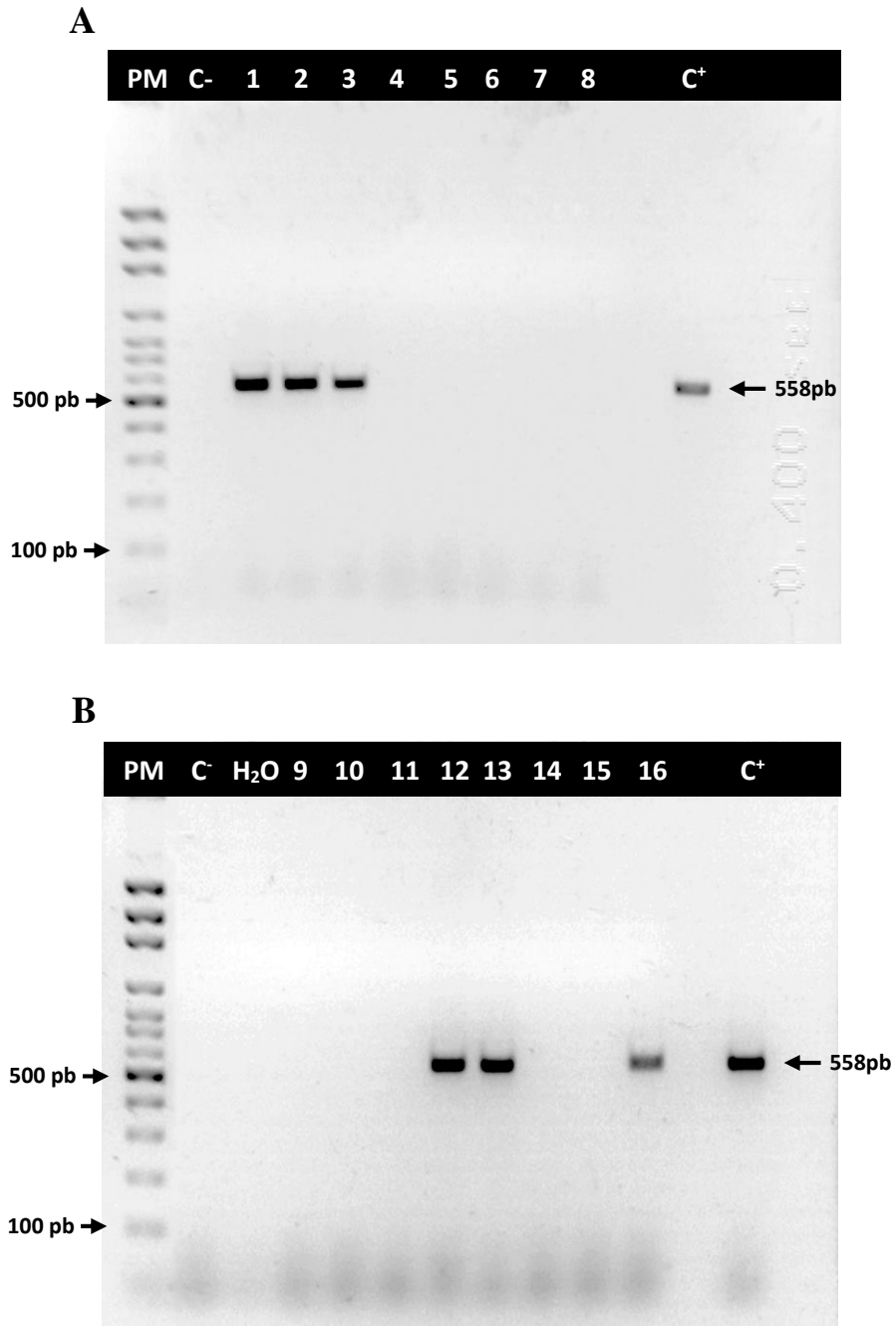


Figura 15. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa 2% de los productos de PCR del gen *cry1*. PM: Marcador Peso Molecular 100 pb. C⁻: Control negativo (*Bacillus cereus*). C⁺: Control Positivo (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1). H₂O: Agua. Figura 13-A: Carriles 1 al 8: cepas 1 a la 8. Figura 13-B: Carriles 9-16: cepas 9 a la 16.

Se observa en la figura 15 (A y B) que las muestras 1, 2, 3, 12, 13 y 16 presentaron el amplicón del tamaño esperado de 558 pb. Por lo tanto, de las 16 muestras procesadas solo 6 presentaron el gen *cry1*. De la misma forma, se muestra la reacción de amplificación con el DNA templado del control positivo. Mientras que no hubo amplificación en el control negativo (DNA de *Bc*) ni en el control de reactivos (H₂O).

De las 6 cepas que resultaron positivas a la presencia del gen *cry1*, 3 correspondieron a ZI y las otras 3 a ZNI con actividad agrícola.

- **Patrón de proteínas de las cepas aisladas**

La caracterización bioquímica de las 16 cepas, también se realizó mediante el análisis del patrón de proteínas por electroforesis en geles de acrilamida, en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), propuesta por Laemmli (1970).

En la figura 16 se muestra un registro del gel con el patrón de bandas del control positivo, donde se pudo observar el perfil característico del cristal de *Btk*, el cual no se observó en el control negativo.

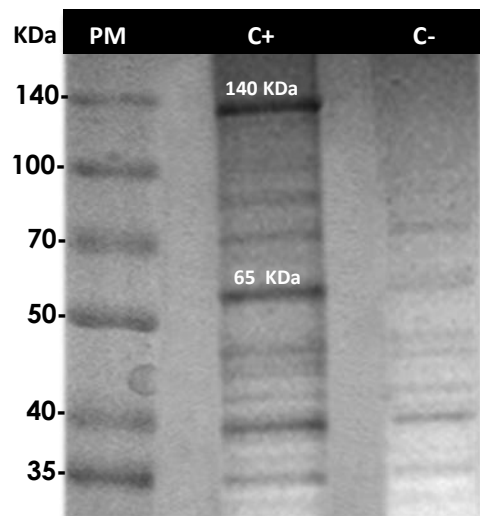
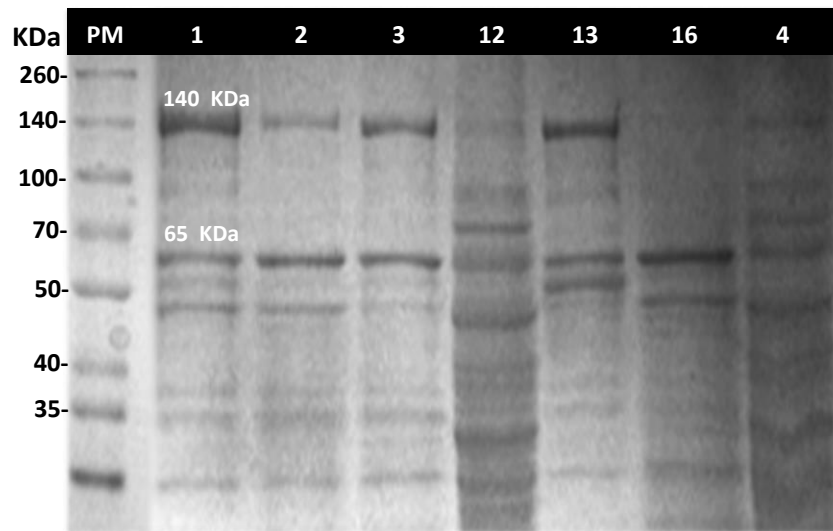


Figura 16. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de acrilamida 10% en condiciones desnaturalizantes de las cepas de referencia. PM: Marcador de Peso Molecular (KDa). C+: Control positivo (*Btk*). C-: Control negativo (*Bc*).

Al observar el perfil de proteínas del control positivo, se evidenció la presencia de dos bandas dominantes; una de 140 KDa y una de 65 KDa, características de la proteína Cry1. En el control negativo no se visualizaron bandas de altos pesos moleculares (> 90 KDa).

Paralelamente, se realizó el análisis del patrón de bandas de las 16 cepas presuntivas de *Bt*, de las cuales 9 presentaron el patrón de proteínas característico de *Btk* (figura 17).

A



B

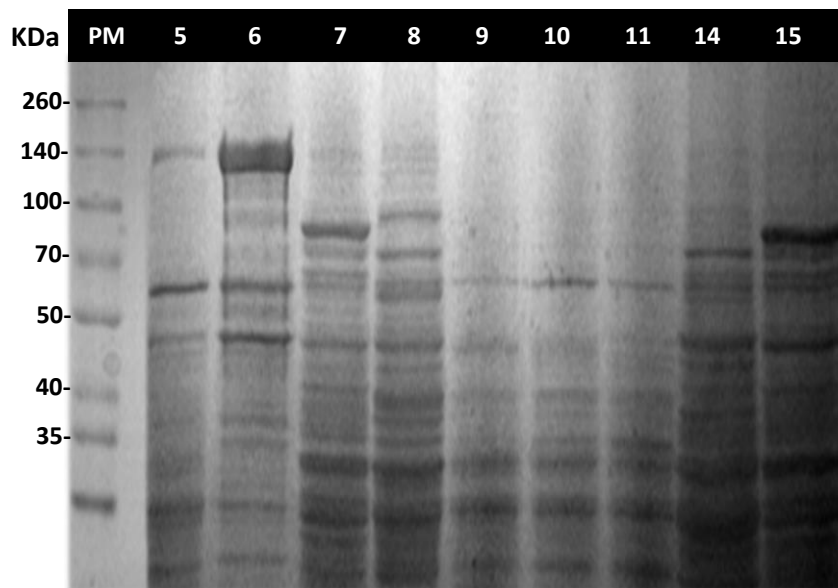


Figura 17. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de acrilamida 10 % en condiciones desnaturalizantes de las 16 cepas con posibilidades de *Btk*. PM: Marcador de peso Molecular (KDa). Figura 14-A: cepas 1, 2, 3, 12, 13, 16 y 4. Figura 14-B: cepas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 y 15.

En la figura 17 se observan el perfil esperado para las cepas que resultaron positivas por PCR. Adicionalmente, las muestras 4, 5 y 6 también mostraron el mismo patrón. Por lo

tanto, de las 16 muestras analizadas, 9 presentaron las bandas de 140 KDa y 65 KDa características de *Btk*.

En vista de la visualización tenue de la banda de 140 KDa en las muestras 12 y 16, estas cepas fueron sometidas a otras técnicas desnaturalizantes (Tampón Carbono Bicarbonato pH 10 y SDS 20 %) logrando confirmar la presencia de la proteína de interés (figura 18).

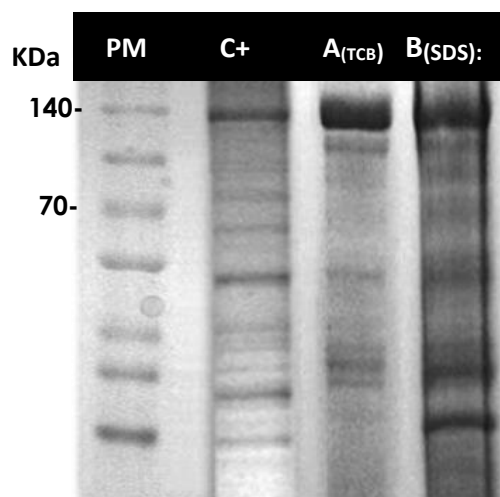


Figura 18. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de acrilamida 10 % en condiciones desnaturalizantes de las cepas 12 y 16. PM: Marcador de Peso Molecular (KDa). C+: Control positivo (*Btk*). A_(TCB): cepa 12 con Tampón Carbono Bicarbonato (TCB). B_(SDS): cepa 16 con Dodecilsulfato Sódico (SDS).

En la figura 18 se logró visualizar el patrón de proteína de alto peso molecular (140 KDa) en las muestras 12 y 16 coincidiendo con lo observado en el control positivo. Con estas técnicas de solubilización no se evidenció la banda de 65 KDa para estas cepas.

- **Análisis *in silico* de secuencias del gen *cry1***

Al implementar las técnicas para la identificación de *B. thuringiensis* (PCR y SDS-PAGE), se observó que los resultados no eran equiparables en su totalidad, debido a la presencia del patrón de banda característico de *Btk* en tres cepas (4, 5 y 6) que no mostraron

el producto de PCR, utilizando los cebadores propuestos por Bravo *et al.* (1998). Por lo tanto, se analizaron secuencias de genes *cry1* publicadas en la base de datos del GeneBank, a través del programa MultAlin, versión 5.4.1 (tabla 14). De esta manera, se identificaron las zonas en donde hibridan los oligonucleótidos, para verificar el grado de conservación de estas regiones.

Tabla 14. Secuencias nucleotídicas del gen *cry1* extraídas de la base de datos del GeneBank.

Secuencias de <i>cry1</i>	Año	Nº Acceso *
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain 1K endotoxin <i>cry1Aa</i> gene, partial cds	2015	KR612323.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>shandongiensis</i> strain H22 <i>Cry1Ac</i> (<i>cry1Ac</i>) gene, partial cds	2013	JN257713.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 29730 <i>Cry1</i> (<i>cry1</i>) gene, partial cds	2011	HQ222846.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> partial <i>cry1</i> gene for delta endotoxin, strain 2408	2008	AM941071.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> delta-endotoxin <i>cry1</i> gene, complete cds	2003	AF288683.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> plasmid-encoded lepidoteran-specific toxin (<i>cry1</i>) gene, complete cds	1999	AF081248.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> insecticidal crystal protein (<i>cry1</i>) gene, complete cds	1999	AF081790.1
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> crystal protein (<i>cryIA(c)</i>) gene, complete cds	1997	U87397.1
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> insecticidal delta-endotoxin <i>CryIA(c)</i> (<i>cryIA(c)</i>) gene, complete cds	1997	U87793.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> strain HD-1 insecticidal crystal protein (<i>cry1A</i>) gene, partial cds	2011	JF699284.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> plasmid pUCBtS93 crystal protein (<i>cry1Ab</i>) gene, complete cds	2002	AF059670.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> 135 kDa insecticidal protein gene, complete cds	1999	AF154676.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> clone 44 <i>cry1A</i> type crystal protein gene, partial cds	2004	AY570733.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> megaplasmid fragment partial <i>cry1Ac</i> gene for pesticidal crystal protein <i>cry1Ac</i> , allele <i>cry1Ac23</i>	2008	AM949588.1

*: Base de datos del GeneBank

En la figura 19 se muestran los alineamiento parciales de las secuencias del gen *cry1* de los cebadores propuestos por Bravo *et al.* (1998).

A

	5'				3'
	2651				2700
gral-cry1 (f)	CTGGATTAC	AGGTGGGGAT	AT.....
KR612323.1	CAGGATTAC	AGGAGGAGAT	ATTCCTTCGAA	GAACTTCACC	TGGCCAGAT.
AF288683.1	CAGGATTAC	AGGTGGGGAC	ATCCTTCGAA	GAACTTCACC	TGGTAACTT.
AF081248.1	CAGGATTAC	AGGAGGAGAT	ATTCCTTCGAA	GAACTTCACC	TGGCCTGAT.
AF081790.1	CAGGATTAC	AGGAGGAGAT	ATTCCTTCGAA	GAACTTCACC	TGGCCTGAT.
JF699284.1	CAGGATTAC	AGGAGGAGAT	ATTCCTTCGAA	GAACTTCACC	TGGCCAGAT.
AF154676.1	CAGGATTAC	AGGAGGAGAT	ATTCCTTCGAA	GAACTTCACC	TGGCCAGAT.
U87397.1	CAGGATTAC	TGGTGGGGAC	TTAGTTAGAT	TAAATAGTAG	TGGAAATAAC
U87793.1	CAGGATTAC	TGGTGGGGAC	TTAGTTAGAT	TAAATAGTAG	TGGAAATAAC
AF059670.1	CAGGATTAC	AGGAGGAGAT	ATTCCTTCGAA	GAACTTCACC	TGGCCAGAT.
AM949588.1	CAGGATTAC	TGGTGGGGAC	TTAGTTAGAT	TAAATAGTAG	TGGAAATAAC
AY570733.1	CAGGATTAC	TGGTGGGGAC	TTAGTTAGAT	TAAATAGTAG	TGGAAATAAC
HQ222846.1	YRGGATTAC	AGGWGGRGAT	ATTCCTTCGAA	GAACTTCACC	TGGCCAGAT.
JN257713.1	CAGGATTAC	TGGTGGGGAC	TTAGTTAGAT	TAAATAGTAG	TGGAAATAAC
AM941071.1
JN205069.1
Consenso	caggatttac	agg.gg.ga.	.t..tt.ga.	.aa.t.....	tgg..a.a..

B

	5'				3'
	3201				3250
gral-cry1 (r)	AGTCAAAATAT	GCGAAGCGAC	TCA.....
KR612323.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TTAGTGATGA	GCGGAATTTA
AF288683.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TCAGTGATGA	GCGGAATTTA
AF081248.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TTAGTGATGA	GCGGAATTTA
AF081790.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TTAGTGATGA	GCGGAATTTA
JF699284.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TTAGTGATGA	GCGGAATTTA
AF154676.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TTAGTGATGA	GCGGAATTTA
U87397.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TCAGTGATGA	ACGCAATTTA
U87793.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TCAGTGATGA	ACGCAATTTA
AF059670.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TTAGTGATGA	GCGGAATTTA
AM949588.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TCAGTGATGA	ACGCAATTTA
AY570733.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TCAGTGATGA	ACGCAATTTA
HQ222846.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TTAGTGATGA	GCGGAATTTA
JN257713.1	TGTCCGAGAA	AGTCAAACAT	GCGAAGCGAC	TCAGTGATGA	ACGCAATTTA
AM941071.1	TACTTGAGAA	AGTGAATAT	GCGAAACGAC	TCAGTGATGA	AAGAACTTA
JN205069.1
Consenso	tgtccgagaa	agtcaaacat	gcgaaagcgac	t.agtgatga	.cg.aattta

Figura 19. Alineamientos parciales de las secuencias del gen *cry1* reportadas con los cebadores propuestos por Bravo *et al.* (1998). A: región de hibridación para el cebador gral-cry1 (f). B: región de hibridación para el cebador gral-cry1 (r). Rojo: Sustituciones de nucleótidos en las secuencias con respecto al cebador. Azul: nucleótidos no conservados entre las secuencias. Negro: nucleótidos conservados.

Al observar el alineamiento de las diferentes secuencias del gen *cry1* con los cebadores, se demostró variación en la serie de nucleótidos que conforman la región de hibridación del iniciador *gral-cry1* (f). En esta región se logró detectar hasta seis sustituciones nucleotídicas con respecto a este cebador (figura 18-A). Por otra parte, en la región de hibridación del cebador *gral-cry1* (r) mostró un mayor grado de conservación evidenciando una sustitución nucleotídica en la mayoría de las secuencias analizadas.

No obstante, con el propósito de verificar el comportamiento de otros iniciadores con las mismas secuencia, se realizó el análisis de alineamiento parcial utilizando cebadores generales para el gen *cry1* propuestos por Ben Dov *et al.* (1997). Los resultados de este alineamiento se muestran en la figura 20.

A

	4001				4050
Unil (d)	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AAC.....
AF288683.1	CGAATATCGC	GATAATTCAT	GCGGCAGATA	AACGCGTTCA	TAGCATTCGA
AF081248.1	CGAATATTGC	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACGTGTTCA	TAGCATTCGA
AF081790.1	CGAATATTGC	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACGTGTTCA	TAGCATTCGA
JF699284.1	CGAATATTGC	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACGTGTTCA	TAGCATTCGA
AF154676.1	CGAATATTGC	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACGTGTTCA	TAGCATTCGA
U87397.1	CGAATATTGC	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACGTGTTCA	TAGCATTCGA
U87793.1	CGAATATTGC	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACGTGTTCA	TAGCATTCGA
AF059670.1	CCAACATCGC	GATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACGCGTTCA	TAGCATTCGA
HQ222846.1	CGAATATTGC	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACGTGTTCA	TAGCATTCGA
AM941071.1	CAAACATCGG	CATGATTCAT	GCGGCAGATA	AACTTGTTCA	TCGAATTCGA
Consensus	c....at...	.atgattcat	gcggcagata	aac..gt.caga

B

	4251				4300
Unil (r)AA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AA.....
AF288683.1	GTCCTTGTTG	TTCC..AGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAGGTTTCG
AF081248.1	GTCCTTGTTG	TTCC..GGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAAGTTTCG
AF081790.1	GTCCTTGTTG	TTCC..GGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAAGTTTCG
JF699284.1	GTCCTTGTTG	TTCC..GGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAAGTTTCG
AF154676.1	GTCCTTGTTG	TTCC..GGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAAGTTTCG
U87397.1	GTCCTTGTTG	TTCC..GGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAAGTTTCG
U87793.1	GTCCTTGTTG	TTCC..GGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAAGTTTCG
AF059670.1	GTCCTTGTTG	TTCC..GGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAAGTTTCG
HQ222846.1	GTCCTTGTTG	TTCC..GGAA	TGGGAAGCAG	.AAGTGTAC	AAGAAGTTTCG
AM941071.1	GNCCTTGTTA	TGCCAGACA	TGGGAAGCAG	CAAGTGTNC	ATTGGNACCG
Consensus	..c.ttg.t.	t.c.....aa	tgggaagcag	.aagtgtc.c	a.....c.

Figura 20. Alineamientos parciales de las secuencias del gen *cry1* reportadas con los cebadores propuestos por Ben Dov *et al.* (1997). A: región de hibridación para el cebador Unil (d). B: región de hibridación para el cebador Unil (r). Rojo: Sustituciones de nucleótidos en las secuencias con respecto al cebador. Azul: nucleótidos no conservados entre las secuencias. Negro: nucleótidos conservados.

En la figura 20 se observa que el alineamiento de las diferentes secuencias del gen *cry1* con los cebadores diseñados por Ben Dov *et al.* (1997), presenta poca variación en la serie de nucleótidos que conforman la región de hibridación del iniciador Unid1 (d), donde se logró detectar seis sustituciones nucleotídicas con respecto a este cebador (figura 20-A).

Asimismo, en la región de hibridación del cebador Unid1 (r) mostró un mayor grado de conservación evidenciando tres sustituciones nucleotídicas. Sin embargo, esas variaciones corresponden a una sola secuencia (GenBank: AM941071.1).

Aquellos aislados considerados *Btk*, basados en pruebas bioquímicas y moleculares, fueron sometidos nuevamente a observación en el microscopio óptico a 1000X con una cámara Nikon optiphot-2 acoplada, para corroborar la forma bipiramidal del cristal. En la figura 21 se observa claramente la morfología del cristal de la muestra 13.

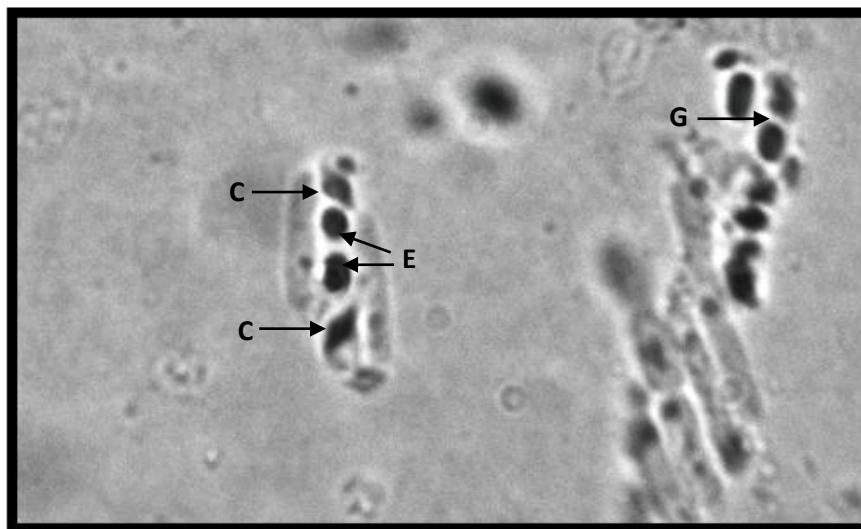


Figura 21. Micrografía óptica 1000X de la cepa 13 en fase estacionaria de crecimiento. E: espora. C: cristal. G: esporangio.

En figura 21 se pudo observar que el cultivo de la cepa 13 tenía esporas y cristales libres. Del mismo modo, se apreció el esporangio que contiene el complejo espora-cristal. Es de destacar que las esporas no deformaron el perfil bacilar. Además, se observaron pocas células en estado vegetativo y detrito celular. Este mismo resultado se obtuvo con las cepas 1, 2, 3, 12 y 16. Por otra parte, al observar las cepas 4, 5 y 6 al microscopio, se identificaron otras estructuras de inclusión paraesporal (figura 22).

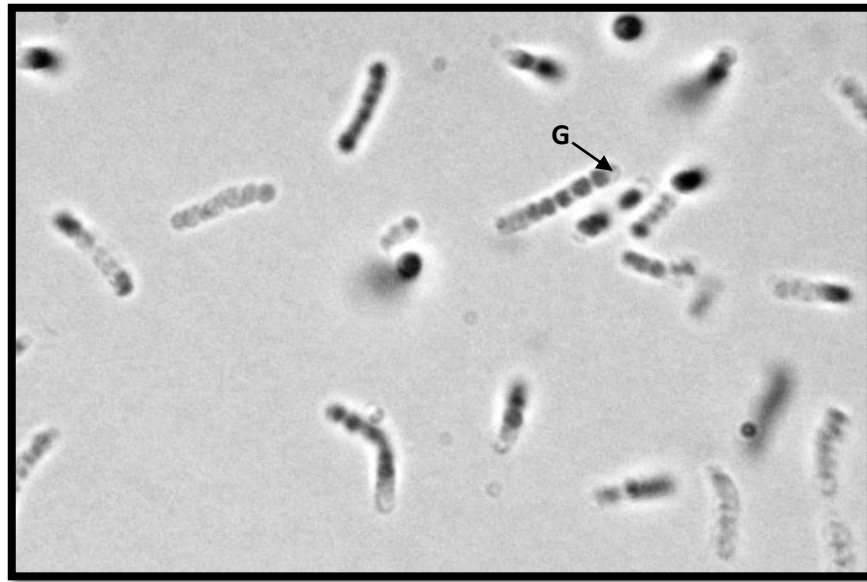


Figura 22. Micrografía óptica 1000X de la cepa 6 en fase estacionaria de crecimiento. G: esporangio.

- **Análisis estadístico de las cepas de *Bt* recolectadas en zonas intervenidas (ZI) y zonas no intervenidas con actividad agrícola (ZNI)**

Con la finalidad de verificar si existe una diferencia estadística significativa entre el número de muestras identificadas como *Bt*, procedentes de zona intervenida (ZI) y no intervenidas con actividad agrícola (ZNI), se realizó una prueba de hipótesis, utilizando el estadístico de prueba T Student de 2 colas (tabla 15).

Tabla 15. Proporciones de *Btk* proveniente de muestras de suelo de zonas intervenidas y no intervenidas con actividad agrícola.

	Zonas agrícolas	Muestras suelo colectadas (A)	Muestras de suelo donde se obtuvieron cepas de <i>Btk</i> (B)	Proporción P= B/A	Promedio de proporciones (P)
1	Intervenida	6	2	0.33	0.138
2	No intervenida	30	3	0.1	

Se plantea como hipótesis nula (H_0) que no existen diferencias significativas entre las proporciones de las cepas de *Btk* colectadas en ZI (P_1) y ZNI (P_2). Como hipótesis alternativa (H_1) se sugiere que las proporciones de *Btk* entre ambas zonas son diferentes.

- $H_0: P_1 - P_2 \Rightarrow P_1 = P_2$
- $H_1: P_1 \neq P_2$

Las condiciones para la realización de la prueba se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Formulación de la regla de decisión del estadístico de prueba

$\alpha/2 = 0.025$ (95% de confiabilidad, significancia de 0,05)

$v = 36 - 2 = 34$ (Grados de libertad)

$t_0 = 2.031$ (valor crítico)

$t = 1.49$ (estadístico de prueba) $P = 0,850$

La prueba estadística realizada permitió inferir con un 95 % de confianza, que no hay diferencia estadísticamente significativa en el número de cepas de *Btk* encontradas en las muestras de suelo procedentes de ZI y ZNI.

Los resultados obtenidos a partir de las diferentes pruebas de identificación se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Resultado de las pruebas de identificación de las cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Actividad agrícola	Muestras de suelo	Fenotipo de la colonia (UFC)	Complejo espora-cristal	Fenotipo Hem ⁺ , Str ^S y Pen ^R (N° colonias)	Gen <i>cry1</i>	Proteína Cry1
Zonas Intervenidas	M9	4	+	4	2	3
	M10	6	+	3	1	3
	M11	4	+	4	0	0
Zonas No Intervenidas	M6	1	+	0	0	0
	M12	1	+	1	0	0
	M15	1	+	1	0	0
	M23	1	+	1	1	1
	M28	1	+	1	1	1
	M31	1	+	1	1	1
Total cepas		20		16	6	9

+: Presencia. -: Ausencia

- **Bioensayos con larvas de *Spodoptera frugiperda***

Con las muestras identificadas como *Btk*, se procedió a evaluar su actividad patogénica contra larvas de *Spodoptera frugiperda*, a través de bioensayos. El promedio de las titulaciones realizadas fue de 6×10^4 esporas/mL.

Los resultados de la mortalidad acumulada durante 5 días consecutivos se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Registro de mortalidad acumulada de *Spodoptera frugiperda*.

Muestras	% mortalidad
H ₂ O (C-)	0
Tween 80 + H ₂ O (C-)	0
<i>Btk</i> (C+)	82
1	36
2	8
3	89
4	22
5	8
6	30
12	84
13	93
16	75

En la tabla 18 se puede observar que las cepas más letales contra larvas de *S. frugiperda* fueron las cepas 3, 12, 13 y 16 las cuales presentaron un porcentaje de mortalidad mayor al 70 %. Por otro lado, las cepas 1, 4 y 6 presentaron bajos porcentajes de mortalidad (< 37 %). Por su parte, las cepas 2 y 5 presentaron un porcentaje del 8 %, siendo estos los tratamientos con el registro de mortalidad más bajo, aparte de lo obtenido con los controles negativos, donde los porcentajes fueron del 0 %. Cabe resaltar, que al utilizar la cepa *Btk* como control positivo se registró un 82 % de mortalidad.

Posteriormente, se realizó el análisis estadístico, donde fueron evaluados los porcentajes de mortalidad a través de una prueba de análisis de la varianza de un factor (ANOVA, de 95 % de confianza) con $p < 0.05$, el cual indicó la existencia de diferencias estadísticamente

significativas entre los tratamientos. Una prueba a *posteriori* de diferencias mínima significativa de Fisher (DMS con significancia de 0,05) determinó las diferencias significativas entre los grupos, los cuales se señalan en la tabla 19.

Tabla 19. Efecto tóxico de los aislados de *Btk* sobre larvas de *S. frugiperda*.

Tratamiento	% mortalidad	± ES
13	93a	± 7
3	89a	± 1
12	84a	± 12
<i>Btk</i> (+)	82a	± 6
16	75ab	± 1
1	36bc	± 16
6	30c	± 14
4	22c	± 2
2	8c	± 8
5	8c	± 0
H ₂ O (C-)	0c	± 0
Tween 80+ H ₂ O (C-)	0c	± 0

Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes según DMS de Fisher ($\alpha < 0.05$).

En la tabla 19 se muestran los resultados del análisis estadístico, donde las cepas son agrupadas según su letalidad. Éstas se encuentran ordenadas de forma descendente, es decir, de la más letal a la menos letal, siendo el grupo “a” los aislados que presentaron mayor porcentaje de mortalidad, correspondiendo a las cepas 3, 12 y 13 las cuales mostraron una letalidad estadísticamente igual que el control positivo. Además, se observa que cuatro aislados presenta una letalidad estadísticamente igual que el control negativo.

En la figura 23 se evidencia una larva muerta de *Spodoptera frugiperda* una vez aplicado el tratamiento con la cepa 13.



Figura 23. Larva muerta de *Spodoptera frugiperda*, después de aplicado el tratamiento con la cepa 13.

No obstante, para verificar si las larvas ingirieron el complejo espora-cristal, se procedió a evaluar el macerado de las mismas, el cual fue sembrado por agotamiento en placas de Agar-Penicilina, observando el crecimiento de colonias con el morfotipo característico de *Bt* (figura 24).



Figura 24. Colonias con morfotipo característico de *Bt*, obtenidas del macerado de larva tratada con la cepa 13.

DISCUSIÓN

Durante los últimos 60 años, *Bacillus thuringiensis* ha sido objeto de estudio de muchos investigadores, en virtud de su estrecho rango de especificidad que le otorga una alta toxicidad selectiva, sin impacto negativo al ambiente al ser utilizado como bioinsecticida (Sauka y Benintende, 2008). Es por ello, que se han realizado aislamientos de cepas provenientes de distintos tipos de ambientes, con el propósito de aislar aquellas que presenten mayor actividad patogénica contra varios tipos de insectos (Carmona, 2002). Debido a que las muestras de suelo suelen ser la fuente más importante de *Bt* (Martin y Travers, 1989), en este estudio se realizó el aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo de alta montaña.

Tomando en cuenta que la espora de *Bt* es altamente tolerante a las condiciones ambientales y sufre dispersión por efecto del agua, viento, animales y hombre (por efecto del comercio de productos agrícolas de almacenamiento) (Bernhard *et al.*, 1998), las muestras fueron colectadas descartando la capa superficial del suelo, pues se ha reportado que las esporas de *Bt* se encuentran en mayor proporción en este nivel (Martin y Travers, 1989) como mecanismo de protección contra la luz UV. (Porcar y Juárez- Pérez, 2004).

Con la finalidad de poder contabilizar las colonias aisladas de *Bt* procedentes de las muestras de suelo, y tomando en cuenta que al someterlas a tratamiento térmico, las células en estado vegetativo son eliminadas y las esporas resistentes no se verán afectadas, se hicieron diluciones seriadas y se expusieron a tratamientos con calor, siguiendo las recomendaciones de la OMS (1985). Por esta razón, se observó menor cantidad de colonias totales en las placas con choque térmico en comparación con las placas a las que no se les

aplicó este tratamiento (figura 10). Asimismo, se observó que en la dilución 15/1000 hubo menor presencia de UFC por gramo de suelo analizado que en la dilución 1/20, tanto con el tratamiento térmico como sin éste. Por otra parte, al aplicar choque térmico se observó mayor cantidad de UFC termorresistentes con el morfotipo de *Bt*, diluyendo la muestra de suelo 15/1000 en comparación con la dilución 1/20. Las colonias de *Bt* se caracterizan por ser de medianas a grandes, planas, de borde irregular lobulado y/o arborescente, consistencia blanda, aspecto opaco/mate, pigmentación blanco cremoso (Lawrence, 1997; Galvis y Moreno, 2014). Este tratamiento térmico permitió corroborar su efectividad de la técnica para el aislamiento de posibles cepas de *Bt*.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) comparte características con *Bacillus cereus* (*Bc*), una de ellas es la morfología de la colonia. Sin embargo, el principal rasgo de *Bt*, que la diferencia del resto de las cepas pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus*, es la presencia de una inclusión cristalina que se forma durante la fase esporulativa (Sneath, 1986). De acuerdo a esto, para corroborar la presencia de los cuerpos cristalinos en las cepas, se observaron las colonias a través de un microscopio óptico de contraste de fases, donde solamente 20 cepas presentaron dicha característica (tabla 11). Además, las esporas presentes en los esporangios no deformaban su perfil bacilar, como lo hace *Bacillus sphaericus*; otra bacteria entomopatógena usada para el control de dípteros (Monnerat *et al.*, 2001) Por lo tanto, es probable que estas cepas correspondan a *Bacillus thuringiensis*, donde el cuerpo de inclusión cristalino puede representar el 20-30% del peso seco del esporangio (Bulla *et al.*, 1980; Ibrahim *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de las cepas de *Bt*, tomando en cuenta su capacidad de producir β -hemolisina, su resistencia a penicilina y sensibilidad a la estreptomicina (Porcar y Juárez-Pérez, 2004). Basados en estas características fenotípicas, sólo 16 de los 20 aislados fueron seleccionados como cepas presuntivas de *Bt* (tabla 11).

El método de tratamiento térmico y las pruebas bioquímicas tienen la ventaja de disminuir los costos de investigación, sobre todo si se desea realizar la búsqueda de cepas autóctonas de *Bt* captadas en muestras provenientes de muchas regiones (Gajardo *et al.*, 2012), como es el caso del presente estudio.

Numerosas investigaciones han proporcionado pruebas de que este microorganismo tiene una amplia distribución en suelos de todo el mundo. Existe reportes de su presencia en Japón (Sasaki *et al.*, 1994; Kikuta *et al.*, 2001); Grecia (Aptosoglou *et al.*, 1997); España (Iriarte *et al.*, 1998; Quesada *et al.*, 2004); Vietnam (Yasutake *et al.*, 2006); Venezuela (Carmona, 2002; Gajardo *et al.*, 2012); y más de 30 países alrededor de los 5 continentes (Martin y Travers, 1989); desde costas hasta altas montañas y de zonas tropicales hasta altas latitudes (Ohba, 2011). En este trabajo los aislados obtenidos provenían de muestras de suelos de alta montaña (>3000 m.s.n.m.), tanto de zonas intervenidas (ZI) como no intervenidas con actividad agrícola (ZNI). La relevancia de tomar las muestras en zonas intervenidas y no intervenidas es poder determinar si las cepas de *Btk* aisladas no fueron introducidas por actividades antrópicas, es decir, que se traten de cepas nativas de la población de Gavidia, Edo. Mérida.

Las muestras de suelo colectadas en ZI correspondían a sembradíos de papa, siendo éste el principal producto de cosecha en la población de Gavidia, Edo. Mérida. Las principales plagas de insectos de dichos cultivos son del orden Lepidóptera (*Phthorimaea operculella*; *Agrotis ipsilon* y *Copitarsia consueta*) y Coleóptera (*Premnotrypes* spp; *Epitrix* spp y *Agriotes* spp) (Contreras *et al.*, 2006). Por otra parte, se tomaron como ZNI aquellas donde no se realizaban actividades agrícolas, con una vegetación natural de tipo rosetal-arbustal, característico de la formación Páramo Andino (Monasterio, 1980). De acuerdo a esto, el porcentaje de esporas termorresistentes encontradas en las ZNI fue de 2,7 %, mientras que en las ZI fue de 1,7 %.

En zonas intervenidas con actividad agrícola podría considerarse la posibilidad de que la presencia de cepas de *Bt* se deba a tratamientos con bioinsecticidas formulados con base en *Bt*, para el control de plagas en la papa. No obstante, este método de control biológico no ha sido aplicado en la población de Gavidia, ya que los tratamientos aplicados para el control de estas plagas son de origen químico. Por lo tanto, todas las posibles cepas de *Bt* recolectadas en ZI corresponden a cepas autóctonas, al igual que aquellas colectadas en ZNI.

La capacidad tóxica de *Bt* radica en la formación de los cristales paraesporales. Estos cuerpos cristalinos están constituidos principalmente por proteínas Cry, siendo éste el producto final de la expresión de los genes *cry*. Generalmente, es posible correlacionar el tipo de gen *cry* presente en una determinada cepa con su actividad insecticida. Por lo tanto, la identificación del contenido génico *cry* de una cepa de *Bt* puede utilizarse para efectuar dicha predicción (Porcar y Juárez-Pérez, 2003). En este sentido, varias investigaciones han utilizado herramientas moleculares, como la técnica de PCR para la identificación y

clasificación de cepas de *Bt*, basado en la amplificación de los distintos genes *cry* (Cerón *et al.*, 1995). Esto se debe a su alta sensibilidad y especificidad, aunado a la rapidez y facilidad de la técnica, por lo que se ha recomendado su uso como protocolo de rutina para la identificación de esta bacteria en diversos laboratorios (Cerón *et al.*, 1994). En consecuencia se han diseñado múltiples cebadores específicos para cada gen *cry*, lo que ha permitido no sólo evaluar la presencia de la bacteria en distintas zonas (Porcar y Juárez-Pérez, 2003; Noguera e Ibarra, 2010) y su frecuencia de aparición (Noguera e Ibarra, 2010), sino también ha permitido la caracterización genética de los diversos genes *cry* (Ibrahim *et al.*, 2010). En consecuencia estos estudios han llevado a la identificación de novedosas proteínas Cry con actividad bioinsecticida (Cerón *et al.*, 1995).

En virtud a lo expuesto anteriormente, en este trabajo se realizó la identificación molecular de cepas de *Bt* mediante la técnica PCR, empleando los cebadores que amplifican un fragmento correspondiente al gen *cryI* (Bravo *et al.*, 1998), el cual codifica la proteína Cry1 con actividad tóxica contra larvas de lepidópteros (Bravo *et al.*, 1998; Carmona, 2002). Estos cebadores han sido utilizados en diferentes trabajos de investigación en la caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bozlağan *et al.*, 2010; Vilas-Bôas y Franco, 2004; Álvarez *et al.*, 2009). Para ello, se realizó el aislamiento del DNA de aquellas colonias que presentaron el fenotipo específico para *Bt* (tabla 11).

Tomando en cuenta que la sensibilidad de técnica de PCR depende principalmente de la calidad y cantidad del DNA (González *et al.*, 2006a; González *et al.*, 2006b; McPherson y Møller, 2006), para la extracción y aislamiento del mismo, se realizaron choques térmicos a los aislados a 100 °C y -140 °C, empleando para ello vapores de nitrógeno líquido, lo que

permitió la optimización del protocolo descrito por Bravo *et al.* (1998), garantizando un mejor rompimiento de la bacteria, lo que se traduce en una mayor cantidad y con mejor integridad del DNA obtenido (tabla 13). Posteriormente, al realizar la PCR con los cebadores específicos *gral-cry1*, se visualizó la banda esperada de 558 pb, en 6 de las 16 muestras evaluadas (tabla 17), lo que confirma que estas 6 cepas corresponden a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. El control con la cepa de referencia, *B. thuringiensis* var *kurstaki*, confirmó la especificidad del ensayo al obtener amplicón del tamaño esperado, mientras que al utilizar DNA de *B. cereus* no hubo amplificación. Adicionalmente, de acuerdo a lo recomendado por Cerón *et al.* (1995), la reproducibilidad de los resultados fue garantizada mediante repeticiones del mismo ensayo de PCR (resultados no mostrados).

De acuerdo a resultados obtenidos, se recomienda realizar modificaciones en las condiciones de la PCR, disminuyendo la temperatura de acoplamiento de los iniciadores, con el fin de disminuir su especificidad y poder verificar si bajo esas condiciones ocurre la amplificación del gen *cry1* en los aislados 4, 5 y 6.

Debido a los reportes de variabilidad del gen *cry*, que puede suponer una limitante para la PCR (Cerón *et al.*, 1995), se procedió a corroborar los resultados obtenidos por ésta técnica mediante el análisis del patrón de bandas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), que permite visualizar los perfiles proteicos de los aislados, utilizando las 16 cepas analizadas por PCR. En las figuras 16 y 17 se distingue claramente una banda dominante de 140 KDa, que supone la representación de la proteína de alto peso molecular Cry1Aa, la cual está asociada al cristal bipiramidal de *Btk* (Crickmore *et al.*, 1998). Adicionalmente, se observó una banda dominante de aproximadamente 65 KDa, la cual puede corresponder a la

proteína que constituye el cristal cúbico adosado al cristal bipiramidal (Höfte y Whiteley, 1989). Los patrones de bandas observados en las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13 y 16 son iguales al patrón de banda dominante del control positivo, siendo éste una cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1). Sin embargo, en los aislados 12 y 16, la banda de 140 KDa no logró observarse con claridad.

Tomando en cuenta que los genes *cry1* poseen una secuencia codificante de 3600 pb (Crickmore *et al.*, 1998) y las proteínas que codifican presentan una identidad aminoacídica que puede variar desde más de un 90% hasta menos de un 20% (Sauka y Benintende, 2008), existe una posibilidad de que las cepas 12 y 16 presenten una variabilidad aminoacídica que les confiera propiedades diferentes de solubilización a los cristales, ya que cada cuerpo de inclusión cristalino puede estar constituido por proteínas Cry de una o varias clases (Ibarra y Fererici, 1986; Masson *et al.*, 1998). Estas proteínas se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro (Knowles, 1994), y la estabilidad de estas uniones condiciona el pH de solubilización del cristal, particularmente en el caso de los cristales bipiramidales. Cuando estos puentes están distorsionados, estos cristales son solubles a pH mayores a 9.5, mientras que si permanecen en su estado más estable necesitan un pH superior a 12 para lograrlo (Lu *et al.*, 1994). Por lo tanto, esto sugiere una problemática para la estandarización de la técnica SDS-PAGE. Es por esta razón que se aplicaron métodos de solubilización adicionales, basados en el uso de buffers de diferentes pH, así como detergente a diferentes concentraciones que permitieron observar con claridad el patrón esperado en estas cepas, correspondiente a *Btk* (figura 18).

Adicionalmente, en el SDS-PAGE se visualizaron las bandas características de *Btk* en las cepas 4, 5 y 6, las cuales fueron negativas para la presencia del gen *cry1* mediante la prueba

de PCR. La eficacia de la técnica de PCR depende principalmente de la homología entre los cebadores y las secuencias blanco (McPherson y Møller, 2006). En este caso, la identificación de los genes *cry* se basa en las regiones conservadas que son seleccionadas para el diseño de los cebadores (Porcar y Juárez-Pérez, 2003). Es por este motivo que se realizó un análisis *in silico* a partir de diferentes secuencias del gen *cry1* reportadas en el GeneBank, las cuales fueron alineadas con los cebadores diseñados por Bravo *et al.* (1998). En el alineamiento se destaca que el iniciador *gral-cry1* (f) hibrida en una región poco conservada, donde se pudieron contabilizar hasta 6 sustituciones nucleotídicas (figura 19-A). Esta región corresponde al dominio II de la proteína Cry1, el cual se ha reportado como una región variable entre las subclases de Cry1 (Davalos *et al.*, 2009). Mientras que la región en donde se une el iniciador *gral-cry1*(r) presenta un mayor porcentaje de similitud con el cebador (figura 19-B), correspondiendo ésta al dominio III, de la proteína Cry1, el cual se ha reportado como conservado (Ibrahim *et al.*, 2010).

El diseño de los iniciadores es un factor clave en la PCR; el extremo 3'-OH del cebador es crítico en el procedimiento de amplificación. En efecto, si se hay poca similaridad entre el cebador y el molde, no ocurre la amplificación (Kwok *et al.*, 1994). En consecuencia, cualquier variación en una o dos bases en esa región del DNA molde puede dar lugar a que no ocurra la reacción de PCR. Igualmente, variaciones en el extremo 5'-P podría afectar la amplificación (Porcar y Juárez-Pérez, 2003). Por lo tanto, se infiere que las cepas que no mostraron productos de PCR con los oligonucleótidos utilizados para la detección del gen *cry1*, podrían presentar variaciones significativas en la región del DNA molde donde hibrida el cebador, impidiendo la amplificación del gen y dando como resultado falsos negativos.

Es por ello que tomando en cuenta los resultados de las pruebas fenotípicas y bioquímicas, se infiere que las cepas 4, 5 y 6 corresponden a *Btk*.

En otros trabajos se han propuesto iniciadores generales para la detección el gen *cry1*. Ben-Dov *et al.* (1997) diseñaron unos cebadores que generan un producto de PCR de 227 pb. Al realizar una comparación del sitio de unión del iniciador directo descrito por estos autores y el diseñado por Bravo *et al.* (1998), se observó que el iniciador directo de Ben-Dov *et al.* (1997) hibrida sobre una región del gen más conservada que la región en donde hibrida el directo de Bravo *et al.* (1998), correspondiente al dominio III de la proteína Cry1 (figura 20).

Por otro lado, al realizar la observación de los aislados 4, 5 y 6 mediante un microscopio de contraste de fases, se logró evidenciar unos cuerpos de inclusión que no correspondían a la estructura bipiramidal esperada. De acuerdo a varias investigaciones realizadas, se han reportados diferentes inclusiones paraesporales en especies de *Bacillus* (Aslim *et al.*, 2002), una de estas inclusiones corresponden a poli - β -hidroxibutirato (PHB), esta se encuentra comúnmente en el suelo y es producida por una amplia variedad de microorganismos, el cual constituye un compuesto de almacenamiento. Este compuesto presenta un papel en el proceso de esporulación (Kominek y Halvorson., 1965). Se han reportado este tipo de cuerpos de inclusion en cepa de *B. thuringiensis* HD- 1, cuando hay un exceso de carbono en el medio y una limitación en la fuente de nitrógeno (Benoit *et al.*, 1990). Esto podría explicar la presencia de estas inclusiones en los aislados 4, 5 y 6. Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de estudios que permitan obtener un análisis preciso de estos cuerpos paraesporales.

Al relacionar todas las pruebas de identificación realizadas en este trabajo (tabla 15), se encontró que las muestras con fenotipo de *Btk* recolectadas en ZI corresponden al 33 %. Por otro lado, en zonas sin intervención agrícola los aislados de *Btk* corresponden al 10 %. Al evaluar las diferencias observadas en las proporciones de los aislados que presentaban el gen *cry1*, entre zonas intervenidas (ZI) y zonas no intervenidas (ZNI), se obtuvo que no había una diferencia estadísticamente significativa, lo que podría suponer que estos aislados de *Btk*, obtenidos en ambas zonas, se tratan de cepas nativas de la comunidad de Gavidia, Edo. Mérida. En este sentido, Akiba *et al.* (1986) sugieren que *Bt* no es muy eficiente para proliferar en suelos naturales, en gran parte debido a la presencia de microorganismos del suelo que compiten por los mismos recursos. Por su parte, West *et al.* (1985) proponen que la suplementación del suelo con nutrientes adicionales favorece el crecimiento de este microorganismo. Basado en esto, se infiere que la presencia de cepas de *Btk* en estas zonas se debe a un enriquecimiento del suelo gracias a la descomposición de organismos como plantas, insectos, entre otros, proporcionando ambientes ricos en nutrientes que apoyan la proliferación de *Bt* (Akiba, 1986; Takatsuka y Kunimi, 1998). Esto puede dar una idea de la presencia de *Bt* como microorganismo saprófito en suelos (Ohba, 2011).

Si bien la técnica de PCR ha sido ampliamente utilizada para identificar cepas de *Bt*, basado en la identificación de genes *cry*, se ha propuesto que esta herramienta constituye una primera aproximación para predecir la actividad insecticida de los aislados, antes de realizar los bioensayos que permitirían corroborar la correspondencia de la toxicidad predicha a partir del producto de PCR. De esta manera, se ha establecido que los bioensayos son la única herramienta que asegura la toxicidad de las proteínas producidas por *Bt*, lo que requiere de tiempo, disponibilidad de insectos en el estadio adecuado y dieta adecuada para

mantenerlos. Es por ello, que en este trabajo, se incluyó este procedimiento para evidenciar el grado de toxicidad del complejo espora-cristal de las cepas de *Btk* aisladas. La aplicación del tratamiento se hizo por contaminación superficial de la dieta artificial, tomando en cuenta que el pH de la misma no interfería en la estabilidad del cristal (pH= 5,2) (Carozzi *et al.*, 1991).

Martínez (2004), asegura que una forma general de evaluación de cepas de *Bt* es el número de individuos muertos dentro del total de una población, expresado como porcentaje de mortalidad. Comúnmente, este parámetro se emplea en las evaluaciones preliminares de la actividad de cepas nativas de *Bt*, comparándolas con una cepa patrón, con el fin de alcanzar una mejor selección. Es por esta razón, que en este trabajo, las propiedades entomopatógenas de las cepas nativas de *Bt* aisladas en suelo de la comunidad de Gavidia, fueron comparadas con la cepa control *Btk* (HD-1), ya que la misma ha sido evaluada en su entomotoxicidad sobre larvas de lepidópteros y es ampliamente comercializada por su efectividad.

En general la evaluación de *Bt* se inicia con pruebas preliminares para determinar la actividad de las cepas contra un determinado insecto blanco, empleando rangos altos de concentración del complejo espora-cristal. En este caso, el insecto blanco seleccionado para llevar a cabo los bioensayos fue *Spodoptera frugiperda*. Se recomienda que para las primeras evaluaciones de la toxicidad de las cepas aisladas, se emplee un número de larvas en el orden de 10 a 20, con el fin de economizar materiales y costos. Es posible emplear un número menor de individuos siempre y cuando se tengan repeticiones. Respecto a los tiempos de evaluación del porcentaje de mortalidad, deben estar comprendidos entre 5 y 7 días para lepidópteros (Martínez, 2004). Debido a que el número de cepas positivas para *Btk* fue de 9,

se emplearon 25 larvas de *S. frugiperda* por cada tratamiento. Además, se usó una concentración de espora/mL en el orden de 10^4 . En este sentido, se debe mencionar que una titulación de las esporas termorresistentes constituye una manera efectiva para evaluar la concentración de los cristales de manera indirecta, ya que se estima que la relación entre la espora y el cristal es 1:1 (Ertola, 1987). Esto es posible gracias a que el medio utilizado para el crecimiento de las cepas, presenta todos los requerimientos necesarios para la producción eficiente del cristal (Arcas *et al.*, 1984).

Las mortalidades acumulada durante los 5 días de evaluación, arrojó que las cepas 3, 12, 13 y 16 presentaron los mayores porcentajes de patogenicidad, al igual que el control positivo *Btk* (HD-1). Cabe destacar que al plantearse el aislamiento de cepas a partir de muestras de suelos para establecer una colección, se debe tener en cuenta que no todos los aislados son cepas distintas entre sí. La mayoría de las veces se sobrestima la diversidad de la muestra, para evitar esto, se deben caracterizar los aislados. De este modo, al analizar los aislados 1, 2 y 3 que provenían de la misma muestra de suelo, no solo presentaron el gen *cry1* sino también el mismo perfil proteico, lo que indicaría que se tratan de la misma cepa. Sin embargo, al realizar la evaluación toxicológica de las mismas, el porcentaje más alto de mortalidad lo presentó la cepa 3 (89 %), siendo esta una de las cepas más letal. Por otro lado, los porcentajes presentados por los aislados 1 y 2, fueron 36 % y 8 % respectivamente, siendo uno de los más bajos. Contrariamente a lo planteado, a pesar de provenir de la misma muestra de suelo, estas tres cepas resultaron diferentes. Es importante destacar que los aislados que presentaron un porcentaje de mortalidad igual al control positivo, pueden representar un beneficio para la realización de formulaciones comerciales en el ámbito nacional.

No obstante, la evaluación del potencial insecticida de las cepas 4, 5 y 6 mostró un porcentaje de mortalidad de 22%, 8 % y 30%, respectivamente. Por lo tanto, son aislados que no son adecuados para la realización de formulaciones comerciales. Cabe resaltar, que estos aislados provenían de las muestras de suelo colectadas en zonas con intervención agrícola, por lo tanto es recomendable la realizar estudios que permitan identificar si existe alguna relación entre los cuerpos de inclusión no identificados con respecto a las zonas intervenidas.

La realización de estos bioensayos permitió demostrar que a pesar de ser caracterizadas como cepas de *Btk*, presentan una variabilidad en su actividad tóxica sobre larvas de *S. frugiperda*. Esta toxicidad asociada a los aislados, fue corroborada mediante el análisis morfológico de las colonias provenientes de los macerados de las larvas, a las cuales se les aplicó el tratamiento con el complejo espora-cristal.

Estos resultados de variabilidad patogénica coinciden con lo reportado por Porcar y Juárez (2004) quienes expusieron que el género *Spodoptera* es poco sensible a la variedad *kurstaki*, a pesar de que Dulmage (1970) indica que la variedad *kurstaki* presenta actividad contra más de 100 especies de lepidópteros. Esta variedad en la actividad tóxica de los aislados puede estar asociada a la diversidad de las proteínas Cry, que ha surgido de procesos evolutivos independientes de cada uno de sus dominios, dando como resultado proteínas que presentan actividad biocida con diferentes especificidades (Bravo, 1997). Adicionalmente, Saraswathy y Polumetla (2004) reportan que alrededor del 40 % de las toxinas de *Bt* actualmente identificadas, no presentan actividad patogénica sobre insectos, debido a diversas razones como baja solubilidad en el intestino medio del insecto, la falta de

receptores en la membrana epitelial del intestino medio de las larvas y reducción de las zonas de clivaje de las proteasas.

A través de este trabajo se logró el aislamiento de cepas de *Bt* a partir de muestras colectadas en suelo de alta montaña, las cuales fueron identificadas como cepas nativas de la población de Gavidia, Edo Mérida, a través de pretratamientos con choque térmico, pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares. Asimismo, se pudo analizar la actividad entomopatogénica de dichas cepas por medio de bioensayos, obteniendo de esta manera cepas de *Btk* con actividad patogénica que pueden ser utilizadas para la realización de formulaciones comerciales de producción nacional. Esto podría implicar una disminución en la inversión de productos químicos para el control de plagas que afectan cultivos de interés agrícola. Además, genera menor impacto en el ambiente y no afecta la salud de los consumidores.

CONCLUSIONES

- Se lograron aislar cepas de *Bacillus thuringiensis* a partir de las muestras de suelo colectadas en la población de Gavidia, Edo. Mérida, tanto en zonas intervenidas como no intervenidas con actividad agrícola.
- El procedimiento de aislamiento basado en tratamiento térmico, permitió discriminar aquellas cepas formadoras de esporas termorresistentes, de cepas susceptibles al calor facilitando el proceso de selección.
- La número de aislados obtenidos tanto en zonas intervenidas como no intervenidas con actividad agrícola, no presentaron una diferencia estadísticamente significativa. Adicionalmente, tomando en cuenta que en las zonas intervenidas no se aplicó ningún tipo de biocontrolador con base en *Bt*, permitió inferir que estos aislados pudieran tratarse de cepas nativas de la población de Gavidia.
- La caracterización molecular de los aislados obtenidos, mediante la técnica de PCR para la identificación del gen *cry1*, en conjunto con los análisis bioquímicos y morfológicos del cristal, permitió identificar a 6 de los aislados como cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.
- El análisis bioquímico en gel de poliacrilamida y la observación de los aislados a través de un microscopio óptico permitió la identificación de 3 cepas como *Bacillus thuringiensis*, que no presentaron producto de PCR del gen *cry1* al utilizar la metodología planteada. Además, se observó la producción de inclusiones paraesporales no identificadas.

- La evaluación de las propiedades entomopatógenicas de los aislados obtenidos, sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, permitió observar que sólo 3 aislados presentaron un porcentaje de mortalidad igual al control positivo (> 80 %).
- La evaluación tóxica de las 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* que no presentaron producto PCR para el gen *cry1*, mostraron un porcentaje de mortalidad menor al 40 %.
- A través del análisis *in silico* realizado sobre los iniciadores diseñados por Bravo *et al.* (1998) se pudo evidenciar que la unión de los cebadores con la secuencia blanco ocurre en una región poco conservada del gen *cry1*. A diferencia de los cebadores diseñados por Ben-Dov *et al.* (1997), donde se pudo observar que la zona de hibridación de los cebadores ocurre en una región conservada del gen *cry1*.
- La obtención de cepas nativas con alta actividad patogénica representan una alternativa para la creación de formulaciones comerciales de bioinsecticidas hechos a nivel nacional.

RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas moleculares que permitan la identificación de otros genes *cry*, en los aislados que fueron identificados como *Bacillus thuringiensis*.
- Realizar la secuenciación del DNA de los aislados identificados como *Bacillus thuringiensis*, que permita evaluar si existe una variación en las secuencias nucleotídicas que determinen su actividad tóxica.
- Evaluar los 3 aislados, identificados como *Bt*, que presentaron inclusiones paraesporas no esperadas, que permitan identificar su composición y la relación que pueda presentar con la actividad entomopatógena de estos microorganismos.
- Variar las condiciones de la PCR, disminuyendo la temperatura de acoplamiento de los cebadores, con el fin de poder verificar si ocurre amplificación del gen *cry1* en los aislados 4, 5 y 6.
- Realizar más pruebas que permitan equiparar los resultados de caracterización. Además, se recomienda usar cebadores que hibriden en una región más conservada del gen *cry1*, con el fin de evitar falsos negativos.
- Evaluar el uso de subproductos agroindustriales para una producción económica y efectiva del complejo espora-cristal, que pueda ser utilizado para formulaciones comerciales. Para determinar la eficiencia de producción de cristales en dichos medios, podría utilizarse técnicas inmunológicas ya establecidas en el Laboratorio de Procesos Fermentativos.
- Analizar los efectos que presentan estos aislados en campo, con el fin de evaluar la efectividad contra el insecto de interés y observar el impacto en los organismos no blancos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, M. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 18: 265-267..
- Akiba, Y. 1986. Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*. VII. Fate of *Bacillus thuringiensis* in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, and the fall webworm, *Hyphantria cunea*. Jpn J Appl Entomol Zool 30:99–105
- Álvarez, A., Pera, L., Loto, F., Virla, E., Baigori, M. 2009. Insecticidal crystal proteins from native *Bacillus thuringiensis*- numerical analysis and biological activity against *Spodoptera frugiperda*. Tucuman, Argentina. Biotechnol Lett 31:77–82
- Angus, T.A. 1954. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. Nature 173:545–546.
- Aoki, K., Chigasaki, Y. 1916. Über die Pathogenität der sog. Sottobacillen (Ishiwata) bei Seidenraupen. Bull Imp Sericult Expt Sta 1:97–139
- Aptosoglou, S. G., Sivropoulou, A., & Koliais, S. I. 1997. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* in the environment of the olive in Greece. The new microbiologica, 20(1), 69-76.
- Arango, J., Romero, M., Orduz, S. 2002. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J Appl Microbiol.;92: 466-74.
- Arcas, J., Yantorno, O., Arrars, E., Ertola, R. 1984. A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* Var. *kurstaki*. Biotechnology Letters Vol 6 No 8: 495-500.

- Aronson, A., Beckman, W., Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50, 1-24.
- Artigas, J. N. 1994. Entomología Económica. Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos). Vol. 2. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción.
- Aslim, B., Yüksesdağ, Z., Beyatli, Y. 2002. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. Gazi University, Faculty of Arts and Science, Turkia. Turkish Electronic Journal of Biotechnology. p:24-30, 2002
- Barloy, F., Delécluse, A., Nicolas, L., Lecadet, M.M. 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subs. *malasya*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. J. Bacteriol. 178:3099-3105
- Bechtel, D., Bulla, L. 1982. Ultrastructural analysis of membrane development during *Bacillus thuringiensis* sporulation. J Ultrastruct Res; 79:121-32.
- Ben-Dov, E.Q., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sina, R., Manasherob, R. y colaboradores. 1997. Extended screening by PCR for seven cry group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol; 63(12):4883–90.
- Benoit, T. G., Wilson, G. R., Baygh, C. L. 1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1, , Lett. Appl. Microbiol., 10, 15-18.
- Berliner, E. 1915. Über die schlaffsucht der mehlmotenraupe (*Ephestia kühniella* Zel.) und ihren erregere *Bacillus thuringiensis* n. sp. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 2: 29-56.

- Bernhard, K., Jarret, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Roberts, G. M., Pauli, S. y colaboradores. 1998. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* 70:59–68
- Bozlağan, İ., Ayvaz, A., Öztürk, F., Açıık, L., Akbulut, M., Yılmaz, S. 2010. Detection of the *cry1* gene in *Bacillus thuringiensis* isolates from agricultural fields and their bioactivity against two stored product moth larvae. Erciyes University, Kayseri- TURKEY. *Turk J Agric For* 34. 145-154 © TÜBİTAK. doi:10.3906/tar-0905-19.
- Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179, 2793-2801.
- Bravo, A.; Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C, Ortiz, A., Ortiz, M. y colaboradores. 1998: Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol*, 64: 4965-4972.
- Bravo, A., Cerón, J. 2004. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Universidad Nacional de Colombia, Editorial Buena Semilla, Bogotá, Colombia. ISBN 958-701-401-4.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*; 1667: 38-46.
- Breed, R. 1986. Sneath P. Spore forming gram-positive rods and cocci. En: Butler J, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. p. 1104-207.

- Bulla, L., Bechtel, D., Kramer, K., Shethna, Y., Aronson, A., Fitz-James, P. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *CRC Crit Rev Microbiol*; 8: 147-204.
- Carlson, C. R., D. A. Caugant, Kolstø, A. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1719–1725.
- Carmona, A. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera: noctuidae). Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Barquisimeto, Venezuela *Bioagro* 14(1): 3-10.
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S., Koziel, M.G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3057-3061.
- Casmuz, A., Juárez, M.L., Socías, M. G, Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink E. y colaboradores. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69 (3-4): 209-231.
- Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortíz, A., Ortíz, M., Bravo, A., Aranda, E. y colaboradores. 1994. PCR Analysis of the *cryI* Insecticidal Crystal Family Genes from *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México, *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 60, No. 1. p. 353-356.
- Cerón, J., Ortíz, A., Quintero, R., Güereca, L., Bravo, A. 1995. Specific PCR Primers Directed To Identify *cryI* and *cryIII* Genes within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Applied And Environmental Microbiology. Vol. 61, No. 11, p. 3826–3831.

- Chak, K., Chao, D., Tseng, M., Kao, S., Tuan, S., Feng T. 1994. Determination and Distribution of cry-Type Genes of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Taiwan. Applied And Environmental Microbiology, P. 2415-2420 Vol. 60, No. 7
- Contreras, I., Molina, O., González, B. 2006. Negociación de los Pesticidas utilizados para el control de plagas y enfermedades- Rubro Papa. Municipio Rangel- Estado Mérida. Visión Gerencial. ISSN: 1317-8822, N° 2, Vol 4.
- Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., *et al.* 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev; 62: 807-13.
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., Massarini, A. 2008. Curtis Biología. 7a edición en español. Editorial Médica Panamericana.
- Davolos, C. C., Guidelli-Thuler, A. M., de Abreu, I. L., Sena, J. A., & Lemos, M. V. 2009. Cry1 genes from *Bacillus thuringiensis*: specificity determination and implications for primer design. Biotechnology letters, 31(12), 1891-1897.
- De Barjac H, Bonnefoi A. 1962. Essai de classification biochimique se sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. Entomophaga; 7:5-31.
- De Barjac, H., Lemille, F. 1970. Presence of flagellar antigenic subfactors in Serotype 3 of *Bacillus thuringiensis*. J Invertebr Pathol 15:139–140.
- De Maagd, R., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet; 17: 193-9.

- Dulmage, H. T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. J Invertebr Pathol 15:232–239.
- Dulmage, H.T., Aizawa, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. IN: Kurstak, E. (ed), Microbial and Viral Pesticides. Marcel Dekker, New York, pp. 209-237.
- Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. University of Oxford, United Kingdom. Microbiol Rev. 1993 Mar; 57(1):1-33.
- Ertola, R. 1987. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. En: Horizons of biochemical engineering. (Ed.) Shuichi Aiba. University of Tokio Press.
- Feitelson, J.S., J. Payne y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. Bio/Technology 10: 271-275.
- Feitelson, J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In Advanced Engineered Pesticides. Edited Kim L. NY. pp 63-72
- Gajardo, R., Vitelli, J., Rodríguez-Lemoine, V., Dorta, B. 2012. Aislamiento y Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 en el nororiente de Venezuela. En: Hernandez JV, Osborn F & JE Conde (Eds.). Estudios multidisciplinarios de las palometa peluda *Hylesia metabus*. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. Pp. 113-128.
- Galvis, F., Moreno, L. 2014. Caracterización molecular mediante rep-pcr de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*, obtenidos de muestras de suelo. Universidad de Santander, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. Agronomía Costarricense 38(1): 223-229

- Ghassemi, M., Fargo, L., Painter, P., Quinlivan, S., Scofield, R., Takata, A. 1981. Environmental fates and impact of major forest use pesticides, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. (1981). US Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, A169-A194.
- Glazer, A.N., Nikaido, H. 1995. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. New York: W.H. Freeman and Company.
- Goldberg, L. J., Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univertattus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. Mosq News 37:355–358
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M. 2002. 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; 513: 242-6.
- González, J.L., Loza, A., Chacón, E. 2006a. Sensitivity of different *Trypanosoma vivax* specific primers for the diagnosis of livestock trypanosomosis using different DNA extraction methods. Veterinary Parasitology 136, 119–126.
- González, E., González-Baradat, B., González, R., Linares, N., Mijares, A., Perrone, T., Mendoza, M. 2006b. Desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la trypanosomosis animal causada por *Trypanosoma evansi*. Agronomía Tropical 56, 496–500.
- González-Cabrera J. 2001. 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, p. 169-87.

- Gordon, R., Haynes, W., Pang, C. 1973. The genus *Bacillus*. En: US Department of Agriculture handbook N° 427. p. 109-26.
- Griko, N., Rose-Young, L., Zhang, X., Carpenter, L., Candas, M., Ibrahim, M.A. 2007. 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.
- Gupta, B.L., Dow, J.A., Hall, T.A., Harvey, W.R. 1985. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions and electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta* in vitro. *J. cell Sci.* 74, 137-152.
- Gutiérrez, M. A. 1984. Factores interferentes en la captura de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) probando dos tipos de trampas de feromonas (Z)-9-DODECEN-1-OL-ACETATO. Tesis de Licenciatura. Villaflores, Chiapas, México.
- Hannay, C. L., Fitz-James, P.C. 1955. The proteins crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Can J Microbiol* 1:694–710
- Höfte, H., Whiteley, H. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*; 53: 242-55.
- Hossain, F., Pray, C., Lu, Y., Huang, J., Fan, C., Hu, R. 2004. Genetically modified cotton and farmers' health in China. *Int J Occup Environ Health*; 10: 296-303.
- Husz, B. 1928. *Bacillus thuringiensis* Berl. A bacterium pathogenic to corn borer larvae. *Int Corn Borer Invest Sci Rep* 1:191–193.

- Ibarra, J., Federici, B. 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J Bacteriol; 165: 527-33.
- Ibarra, J., Del Rincón, M., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L. y colaboradores. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. Appl Environ Microbiol 69: 5269-5274.
- Ibrahim, M., Griko, N., Junker, M., Bulla, L. 2010. *Bacillus thuringiensis*, A genomics and proteomics perspective. Bioengineered Bugs 1:1, 31-50.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M. D., Andrew, R., Murillo, J., Ferré, J., & Caballero, P. 1998. Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. Systematic and applied microbiology, 21(1), 97-106.
- Ishiwata, S. 1901. On a new type of severe flacherie (sotto disease) (original in Japanese). Dainihon Sansi Kaiho 114:1-5.
- Ishiwata, S. 1905. Concerning 'Sotto-Kin' a *Bacillus* of a disease of the silkworm. Rept Assoc Seric Japan 160:1-8.
- Jensen, G., Hensen, B., Eilenberg, J., Mahillon, J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus thuringiensis* and relatives. Environ Microbiol.; 5:631-40.
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincón, G., Damián-Almazo, J., Gill, S. 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. J Biol Chem; 282: 21222-9.

- Jurat-Fuentes, J., Adang, M. 2004. Characterization of a Cry1A receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem*; 271: 3127-35.
- Khetan S. 2001. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan editor. *Microbial Pest Control*, p. 14.
- Kikuta, H., Igarashi, N., Tatebayashi, C., Ogino, S., Murata, K. 2001. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in forest soil of Hokkaido [Japan]. *Journal of Sericultural Science of Japan* (Japan).
- Knowles, B. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. *Advan Insect Physiol*; 24: 175-308.
- Kominek, L. A., Halvorson, H. O. 1965. Metabolism of poly-, -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 90:1251-1259.
- Krieg, A., Huger, A., Lagenbruch, G., Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: a new pathotypes effective against larvae of Coleoptera. *Z Angew Entomol* 96:500–508
- Kumar, H., Mihm, J. A. 2002. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), southwestern corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) damage and grain yield of four maize hybrids in relation to four tillage systems. *Crop Protection*, 21:121-128.
- Kurstak, E. 1962. Donnees sur l'epizootie bacterienne naturelle provoguee par un *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis* sur *Ephestia kuhniella* Zeller. *Entomophaga Mem Hors Ser* 2:245–247

- Kwok, S., Seng-Yung, C., Sninsky, J.J., Wang, A. 1994. A guide to design and use of mismatched and degenerated primers. *PCR Methods Appl.* 4S, 39-47.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lawrence, L. 1997. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Editorial Academic Press, Primera Edición. Wapato, E.U.A.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K., Pruss, B., Kaplan, T., Wiessner- Gunkel, E., y colaboradores. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol*; 48: 1373-82.
- López-Meza, J., Ibarra, J. 1996. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*; 62: 1306-10.
- Lu, H., Rajamohan, F., Dean, D. 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J Bacteriol*; 176: 5554-9.
- Macintosh, S., Stone, T., Sims, S., Hunst, P., Greenplate, J., Marrone, P., Perlak, F., Fischhoff, D., Fuchs, R. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J Invertebr Pathol*, 56: 258-266.
- Marengo, R. J., Foster, R. E., Sanchez, C. A. 1992. Sweet corn response to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) damage during vegetative growth. *Journal of Economic Entomology*, 85:1285-1292
- Martin, P., Travers, R. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 2437-2442.

- Martínez, J. 2004. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. Capítulo 9: 207-232. En: *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. (Eds.) Bravo, A. y Ceron, J. Universidad Nacional de Colombia, Editorial Buena Semilla, Bogotá, Colombia. ISBN 958-701-401-4. 293 pp.
- Masson, L., Erlandson M., Puzstai-Carey, M., Brousseau, R., Juárez-Pérez, V., Frutos, R. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol*; 64: 4782-8.
- McPherson, M., Møller, S. 2006. PCR. Editorial Taylor & Francis Group. Segunda edición, New York, U.S.A.
- Monasterio, M. 1980. Formaciones vegetales de los páramos venezolanos. En M. Monasterio (ed.): Estudios ecológicos en los páramos andinos. Ediciones de la Universidad de Los Andes, Mérida.
- Monnerat, R., Batista, A., De Medeiros, P., Martins, E., Melatti, V., Praca, L.; Dumas, V. y colaboradores. 2007. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, 41: 291- 295.
- Monnerat, R., Ferreira, S., Silva-Werneck, J. y Cabral, J. 2001. Métodos de coleta, isolamento, caracterização e armazenamento de estirpes de *Bacillus sphaericus*. Brazilia: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica 9. 4pp.
- Morales, J., Negrete, F. 2003. El Gusano Cogollero del Maiz (*Spodoptera frugiperda*. Smith). Centro de Investigación Turipaná, Universidad del Sinú. Colombia.

- Murúa, G., Defagó, V., Virla, E. 2003. Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Bol. San. Veg. Plagas 29 (1): 43-51.
- Murúa, M. G., Vera, M. T., Abraham, S., Juárez, M. L., Prieto, S., Head, G. P., Willink, E. 2008. Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina. Ann. Entomol. Soc. Am. 101 (3): 639-649.
- Murúa, M. G., Virla, E. 2004. Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucumán (Argentina). A laboratory study. Acta Zool. Mex. ns. 1 (20): 199-210.
- Nakamura L. 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. Int J Syst Bacteriol; 48: 1031-5.
- Navon, A. 2000: *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. En: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application (ed. J. F. Charles, A. Delécluse y C. Nielsse-LeRoux),. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 355-369
- Noguera, P., Ibarra, J.E. 2010. Detection of New cry Genes of *Bacillus thuringiensis* by Use of a Novel PCR Primer System. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV, Irapuato, Gto., México. Applied And Environmental Microbiology. Vol. 76, No. 18. p. 6150–6155.
- Ohba, M. 2011. N.A. Logan and P. De Vos (eds.), Endospore-forming Soil Bacteria, Soil Biology: Chap. 11 *Bacillus thuringiensis* Diversity in Soil and Phylloplane. Kyushu University, Japón.

- Porcar, M., Juárez-Pérez, V. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. Institut Pasteur- Paris, Francia. FEMS Microbiology Reviews 26: 419-432
- Porcar, M., Juárez-Pérez, V. 2004. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis* en el control biológico (Eds. A. Bravo y J. Cerón) Editorial Buena Semilla. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Quesada-Moraga, E., García-Tóvar, E., Valverde-García, P., & Santiago-Alvarez, C. 2004. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. Microbiological Research, 159(1), 59-71.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., Crickmore, N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? Trends Microbiol. 18, 189e194.
- Rezende, A. M., Cruz, I., Della Lucia, T. M. 1994. Consumo foliar de milho e desenvolvimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) parasitadas por *Chelonus insularis* (Cresson) (Hym.: Braconidae). Ann. Soc. Entomol. Bras. 23 (3): 473-478.
- Roh, J. Y., Jae, Y. C., Ming, S. L., Byung, R. J., Yeon, H. J. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Korea. J. Microbiol. Biotechnol. 17(4), 547–559
- Ruiz De Escudero I., Ibáñez, I., Padilla, M., Carnero, A., Caballero, P. 2004. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. Universidad Pública de Navarra, Pamplona (Navarra). Bol. San. Veg. Plagas, 30: 703-712.

- Sansinenea, E. 2012. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology: Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico. DOI: 10.1007/978-94-007-3021-2_1.
- Saraswathy, N., Kumar, P. 2004. Protein engineering of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. Universidad Católica de Valparaíso – Chile. EJB 7 (2): 0717-3458
- Sasaki, J., Asano, S., Bando, H., Iizuka, T. 1994. Characteristics of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil in Hokkaido area of Japan. Journal of Sericultural Science of Japan (Japan).
- Sauka, D. 2007. 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.
- Sauka, D., Benintende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades, un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev. Arg. de Micro. 40:124-140.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., y colaboradores. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev; 62: 775-806.
- Sneath, P. 1986. Spore forming gram-positive rods and cocci. En: Butler J, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, p. 1104-207.
- Takatsuka, J., Kunimi, Y. 1998. Replication of *Bacillus thuringiensis* in larvae of the Mediterranean flouer moth, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae): growth, sporulation and insecticida activity of parasporal crystals. Appl Entomol Zool 33:479–486

- Torres, E., Cárdenas, H, De La Torres M. 2006. Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas.
- Travers, R., Martin, P., Reichelderfer, C. 1987. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* , 53 (6), 1263-1266.
- Uribe, D., Martinez, W., Cerón, J. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol* 82: 119-127.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, D., *et al.* 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*; 328: 33-7.
- Valverde, L., De Toledo, Z. A., Popich, S. 1995. Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Zool. Lilloana*. 43(1): 131-143.
- Van der Geest, L., Van der Laan, P. 1971. Sources of special materials. In: Burges HD, Hussey NW (eds) *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, NY, pp 741–749.
- Van der Laan, P. 1967. Insect pathology and microbial control. In: van der Laan PA (ed) *Proc Intern Colloq on Insect Path & Microbial Contr*. North-Holland Publishers Co., Amsterdam, pp 252–286.
- Vilas-Bôas, G., Franco, M. 2004. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV/UNESP, Brazil. Can. J. Microbiol.* 50: 605–613.
- Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A.P. Arantes, O.M. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Departamento de Biología General, CCB, UEL, CP 6001, Londrina, Brazil. Can. J. Microbiol.* 53: 673–687. doi:10.1139/W07-029.

- Vitelli, J., Gajardo, R., Lage, L., Fajardo, Y. Dorta, B., Rodriguez, V. 2010. Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muestras de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela. Revista de la Sociedad venezolana de Microbiología. 30:10-16.
- Vouk, V., Klas, Z. 1931. Conditions influencing the growth of the insecticidal fungus *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. Int Corn Borer Invest Sci Rept 4:24–45.
- West, A.W., Burges, H.D., Dixon, T.J., Wyborn, C.H. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. Soil Biol Biochem 17:657–665
- Whalon, M. E., Wingerd, B. A. 2003. *Bt*: mode of action and use. Arch Insect Biochem Physiol 54(4): 200-11.
- Whiteley, H.R., Schnepf, H.E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Microbiol. 40:549-576.
- World Health Organization. 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: United Nations Development Programme/World Health Organization. 24 pp.
- Yasutake, K., Binh, N. D., Kagoshima, K., Uemori, A., Ohgushi, A., Maeda, M., Ohba, M. 2006. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. Canadian journal of microbiology, 52(4), 365-372.

- Zhang, X., Candas, M., Griko, N., Taussig, R., Bulla, L. Jr. 2006. 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; 103: 9897-902.
- Zhang, X., Griko, N., Corona, S., Bulla, L. Jr. 2008. Enhanced bexocytosis 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; 149: 581-8.

CONSULTAS EN LÍNEA

- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 16:10881–10890. <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> [consulta 15 de abril 2016].
- Crickmore, N., Zeigler, D., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., y colaboradores. 2008. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ [consulta 01 de marzo 2016].
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [consulta 03 de abril 2016].

Consultas de GeneBank

- Heikal, A.M., Abdel-Rehem, F., Konswa, O., Edris, S., Solliman, M.E. 2015. Cloning of endotoxin Cry1 Aa (cry1 Aa) gene from *Bacillus thuringiensis* strain 1K. Genbank: KR612323.1.
- Patel, K.D., Ingle, S.S. 2013. RFLP analysis of cry1 and cry2 genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from India. Genbank: JN257713.1

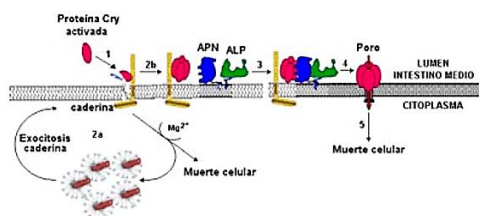
- Janse, I., Hamidjaja, R.A., Bok, J.M., Van Rotterdam, B.J. 2011. Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. Genbank: HQ222846.1
- Dinsdale, A. 2008. Classification of *Bacillus* species. Genbank: AM941071.1
- Li, C., Zhang, J., Li, G. and Huang, D. 2003. A crystal endotoxin from *Bt* strain. Genbank: AF288683.1
- Mustafa, S.A. 1999. Cloning, nucleotide sequence and expression of a new gene encoding lepidopteran-specific toxin. Genbank: AF081248.1.
- Osman, Y.A., Ibrahim, M.A., Ashour, S.A., Bulla, L.A. Jr. 1999. Nucleotide sequence and expression of a cry gene from *Bacillus thuringiensis* strain C12. Genbank: AF081790.1.
- Omolo, E.O., James, M.D., Osir, E.O., Thomson, J.A. 1997. Cloning and expression of a *Bacillus thuringiensis* (L1-2) gene encoding a crystal protein active against *Glossina morsitans morsitans* and *Chilo partellus*. Genbank: U87397.1.
- Herrera, G., Snyman, S.J., Thomson, J.A. 1997. Construction of a Bioinsecticidal Strain of *Pseudomonas fluorescens* Active against the Sugarcane Borer, *Eldana saccharina*. Genbank: U87793.1.
- Lin, H., Liu, S., Guan, X. 2011. *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki strain HD-1 insecticidal crystal protein (cry1A) gene, partial cds. Genbank: JF699284.1.
- Silva-Werneck, J.O., De-Souza, M.T., Dias, J.M., Ribeiro, B.M. 2002. Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki strain S93 effective against the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). Genbank: AF059670.1.

- Hou, B.K., Chen, Z.H. 1999. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 135 kDa insecticidal protein gene, complete cds. Genbank: AF154676.1.
- Li, M.S., Choi, J.Y., Roh, J.Y., Shim, H.J., Boo, K.S., Je, Y.H. 2004. *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* clone 44 cry1A type crystal protein gene, partial cds. Genbank: AY570733.1.
- Kashyap, S., Amla, D.V., Arora, D.K. 2008. The Cry1Ac23 encoding endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1 Dipel: Gene-localization; cloning; characterization; enhanced expression and its structure simulation. Genbank: AM949588.1

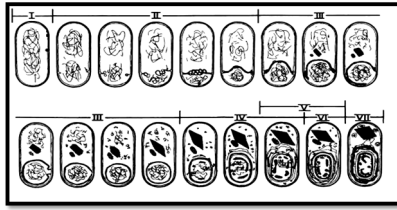
IMÁGENES



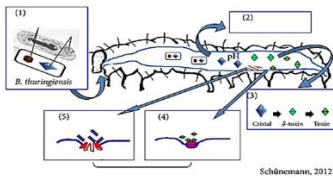
- Torres, E., Cárdenas, H, De La Torres M. 2006. Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas.



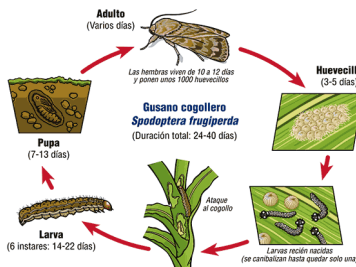
- Sauka, D., Benintende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades, un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev. Arg. de Micro. 40:124-140.



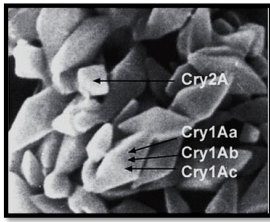
- Bulla, L.A., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.I., Aronson, A.I., Fitz-James, P.C. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. Biochem.. Biophys. Res. Commun. 9:1123:1130. <http://www.fao.org/docrep/t0533e/t0533e04.htm> (consulta: 14 de agosto de 2014).



- <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/135675/fig2/> (consulta: 19 enero 2015).



- [http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/LifeCycle/\\$file/P05gusanoCogollero.gif](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/LifeCycle/$file/P05gusanoCogollero.gif) (consulta: 20 enero 2015).



- <http://wwnorton.com/college/biology/micrograph/single.aspx?fig=222> [consulta: 15 de enero 2015]



- http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm[consulta: 15 de enero 2015]