



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
IPN - CIIDIR - OAXACA**

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS*
THURINGIENSIS CON ACTIVIDAD MOSQUITOCIDA NATIVAS DE OAXACA”**

Juan Reyes Delgado Gamboa

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS
(PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL)**

**DIRECTORES DE TESIS
DR. RAFAEL PÉREZ PACHECO
DR. JORGE E. IBARRA RENDÓN**

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México

Junio de 2011



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 30 del mes de mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: **“Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad mosquitocida nativas de Oaxaca.”**

Presentada por el alumno:

Delgado Apellido paterno	Gamboa materno	Juan Reyes nombre(s)
------------------------------------	--------------------------	--------------------------------

Con registro:

B	0	9	1	4	9	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis



Dr. Rafael Pérez Pacheco



Dr. Jorge Eugenio Barra Rendón



Dr. Alfonso Vázquez López

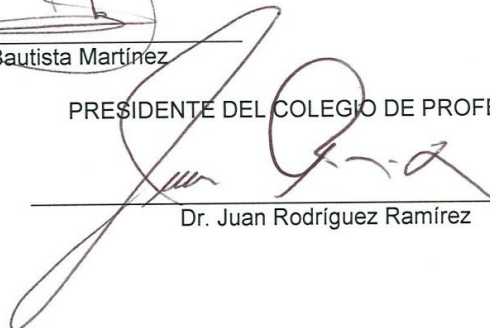


Dr. Jaime Ruiz Vega



Dr. Néstor Bautista Martínez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Juan Rodríguez Ramírez





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 30 del mes mayo del año 2011, el (la) que suscribe **Delgado Gamboa Juan Reyes** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B091494**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dres. Rafael Pérez Pacheco y Jorge Eugenio Ibarra Rendón y cede los derechos del trabajo titulado: **“Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad mosquitocida nativas de Oaxaca.”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación. Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó juan_rdg@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Delgado Gamboa Juan Reyes



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

DEDICATORIA

A mis padres: Adela Gamboa García y Juan Delgado Delgado, por todo el apoyo que me brindaron y porque con su ejemplo me han conducido por el camino de los valores y los principios.

A mi hermana Rosa Deyanira, de quien siempre he recibido cariño y respeto.

A Carlos A. Granados Echevoyen, quien más que un amigo se convirtió en un gran hermano durante mis estudios de maestría.

A la Sra. Lulú, de quien durante mi estancia en Irapuato siempre recibí respeto y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) IPN Unidad Oaxaca, por haberme dado la oportunidad de superarme tanto personal como profesionalmente.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Laboratorio de Bioinsecticidas, por haberme brindado un lugar para llevar a cabo mi estancia de investigación.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco por haber confiado en mí y permitirme llevar a cabo mi estancia de investigación, así como por el tiempo dedicado a la dirección de mi investigación.

Al Dr. Jorge E. Ibarra Rendón, por haberme dado un lugar en su laboratorio y por el tiempo dedicado a la dirección de mi investigación.

A Don Gonzalo por su apoyo incondicional en la BIOPLANTA.

A la maestra Elia Regina Basurto Ríos, por el apoyo brindado en el trabajo de laboratorio, por su amabilidad y orientación.

Al Ing. Javier Luévano Borroel y a Katia Teresa Flores Camarillo, por el gran apoyo brindado en el insectario y por su hospitalidad durante mi estancia en el Laboratorio de Bioinsecticidas.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bioinsecticidas: Addy, Oscar, Verónica, Violeta, Liz, Jacobo, Dulce y Alejandra, por su amistad y compañerismo, así como por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1. Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
3.1.1. Taxonomía.....	5
3.1.2. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
3.2. Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> como bioinsecticida.....	9
3.3. Ecología y Biología de <i>B. thuringiensis</i>	14
3.4. Factores tóxicos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
3.4.1. Las δ -endotoxinas.....	18
3.4.2. Proteínas Cry.....	18
3.4.3. Proteínas Cyt.....	22
3.5. Modo de acción de las toxinas Cry.....	22
3.6. Modo de acción de las toxinas Cyt.....	27
3.7. Resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
3.8. Identificación y caracterización de variedades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
3.8.1. Caracterización morfológica.....	29
3.8.2. Caracterización serológica (Serotipificación).....	30
3.8.3. Caracterización toxicológica y patotipos.....	34
3.8.4. Caracterización genética.....	35
3.8.5. Métodos moleculares basados en el DNA.....	37
3.9. Control de <i>Aedes aegypti</i>	37
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
4.1. Muestreo.....	40
4.2. Aislamiento de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
4.3. Caracterización de los cristales paraesporales.....	42
4.4. Extracción de plásmidos.....	42

4.5	Electroforesis de DNA plasmídico.....	43
4.6	Extracción del DNA total	44
4.7	Amplificación del gen de la flagelina por PCR	44
4.8	Bioensayos con <i>Aedes aegypti</i>	46
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
5.1	Muestreo y aislamiento de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	49
5.2	Caracterización de los cristales paraesporales.....	50
5.3	Análisis de los patrones de plásmidos.....	52
5.4	Amplificación del gen de la flagelina por PCR	57
5.5	Bioensayos de efectividad biológica con <i>Aedes aegypti</i>	59
5.5.1	Bioensayo burdo	59
5.5.2	Bioensayo fino para la determinación de la DL50	60
5.6	Análisis comparativo de la toxicidad de las tres cepas con potencial mosquitocida con respecto a Bti.....	62
VI.	CONCLUSIONES.....	64
VII.	LITERATURA CITADA.....	65

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Productos comerciales a base de <i>B. thuringiensis</i>	12
2	Lista de serovariedades tipo de <i>Bacillus thuringiensis</i> registrados en el Centro Internacional de Bacillus Entomopatógenos del Instituto Pasteur (París Francia).	31
3	Incidencia de <i>Bacillus thuringiensis</i> en las muestras colectadas	49
4	Caracterización morfológica de los cristales en las cepas aisladas de <i>B. thuringiensis</i>	50
5	Bioensayo burdo del complejo espora-cristal de las cepas S4(17), S18(60), S19(65) y <i>Bti</i> con larvas del cuarto instar de <i>A. aegypti</i>	59
6	Porcentaje de mortalidad, CL50 y CL50 del complejo espora-cristal de la cepa control <i>Bti</i> en larvas del cuarto instar de <i>A. aegypti</i>	60
7	Porcentaje de mortalidad, CL50 y CL50 del complejo espora-cristal de la cepa S4 (17) en larvas del cuarto instar de <i>A. aegypti</i>	61
8	Porcentaje de mortalidad, CL50 y CL50 del complejo espora-cristal de la cepa S18 (60) en larvas del cuarto instar de <i>A. aegypti</i>	61
9	Porcentaje de mortalidad, CL50 y CL50 del complejo espora-cristal de la cepa S19(65) en larvas del cuarto instar de <i>A. aegypti</i>	62
10	Toxicidad del complejo espora-cristal de las cepas S4(17), S18(60), S19(65) y <i>Bti</i> con larvas del cuarto instar de <i>Aedes aegypti</i> a las 24 horas	63

INDICE DE FIGURAS

Cuadro		Página
1	Micrografía de <i>B. thuringiensis</i> svar. <i>thuringiensis</i> Berliner 1715 durante la esporulación. Es: espora; CP: Cristal paraspopal	6
2	Cultivo de <i>B. thuringiensis</i> . V) célula en crecimiento vegetativo; En) endospora; Ex) exospora; C) cristal paraesporal	15
3	Micrografías electrónicas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>sotto</i> (A), subsp. <i>sumiyoshiensis</i> (B), subsp. <i>morrisoni</i> (C) y una cepa de serotipo no identificado (D). En todas estas imágenes la endoespora está situada al lado izquierdo del esporangio y el cristal paraesporal al derecho	16
4	Cristales paraesporales con diferentes morfologías: bipiramidal (A), cúbico y esporas (B), redondeado y esporas (C), irregular y esporas (D), poliédrico (E y F). La flecha de la figura F indica la membrana envolvente del cristal	17
5	Dendrograma de las δ -endotoxinas Cry (arriba) y Cyt (abajo). Las líneas verticales indican los límites al 45%, 78% y 95% de homología	20
6	Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry. Longitud relativa de diferentes protoxinas Cry, posición de los cinco bloques conservados (si están presentes) y correspondencia con los dominios I, II y III	21
7	Esquema del modo de acción del complejo espora-cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> en larvas susceptibles	23
8	Longitud relativa de diferentes protoxinas Cry y sitio de corte por proteasas	24
9	Esquema de 2 modelos de acción de las toxinas Cry: A. Modelo de formación de poro (arriba) y B. Modelo de transducción de la señal (abajo)	27
10	Esporangio de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (izquierda) y cuerpo paraesporal con inclusiones	38

	individuales correspondientes a cada toxina de esta subespecie (derecha)	
11	Morfología de cristales a) Cúbico b) Bipiramidal, c) Esférico	51
12	Patrón de plásmidos de cepas nativas tipo <i>B. thuringiensis</i> procedentes de telaraña	52
13	Patrón de plásmidos de cepas nativas tipo de <i>Bacillus thuringiensis</i> procedentes de suelo	53
14	Patrón de plásmidos de cepas nativas tipo de <i>Bacillus thuringiensis</i> procedentes de suelo (continuación)	54
15	Patrón de plásmidos de cepas nativas tipo de <i>Bacillus thuringiensis</i> procedentes de suelo (continuación)	55
16	Patrón de plásmidos de cepas con potencial mosquitocida 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> , 2. S4(17), 3. S18(60), 4. S19(65)	56
17	Electroforesis en geles de agarosa al 1%, donde se muestran los productos de la amplificación por PCR de 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> , 2. S4(17), 3. S18(60), 4. S19(65)	58
18	Electroforesis en geles de agarosa al 1%, donde se muestran los productos de la amplificación por PCR de 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> , 2. S4(17), 3. S18(60), 4. S19(65)	59

RESUMEN

El presente trabajo describe el aislamiento y la caracterización de *Bacillus thuringiensis* Berliner de muestras de suelo, excremento de ganado y telaraña procedentes de Oaxaca, México. En el 80% de las muestras se encontró presencia de *B. thuringiensis*, lo que indica que es un microorganismo abundante en la naturaleza. De 29 cepas aisladas de *B. thuringiensis*, tres presentaron toxicidad contra *Aedes aegypti*. Su efecto sobre larvas del cuarto instar de *A. aegypti* se cuantificó mediante bioensayos, utilizando el complejo espora-cristal y comparando su nivel de toxicidad a la cepa estándar *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Se obtuvieron dos cepas altamente tóxicas a *Aedes aegypti*, cuyas CL50 fueron 10.82 y 13.2ng/ml respectivamente similares a la *Bti* (control, CL50 de 9.43ng/ml) usada como estándar. Las cepas presentan un patrón de plásmidos similar a la *Bti* usada como estándar, así como la amplificación de un fragmento discreto y bien definido del gen de la flagelina, en las cepas bajo estudio. La ultraestructura de los cristales muestra gran semejanza con el patotipo II, con cristales típicamente esféricos. Con el estudio se demuestra la existencia de *B. thuringiensis* en Oaxaca-México, siendo el primer registro de estas cepas mosquitocidas en este estado.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, toxicidad, bioensayo, aislamiento, espora-cristal.

ABSTRACT

This study demonstrated the potencial of the isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner in soil samples, animal droppings and cobwebs of Oaxaca, Mexico. 80% of the samples indicated the presence of *B.thuringiensis*. From 29 isolated corps-3 presented toxicity against *Aedes aegypti*. The effect on mosquito larvae in fourth instar *Aedes aegypti* was quantified by bioassay using the spore crystal and comparing it with standard *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Of the three potential mosquitocida know two showed high levels of toxicity, which presented an LC50 of 10.82 and 13.20ng/ml respectively, similar to the standard *Bti* (9.43ng/ml).

The isolated strains showed a pattern similar to the standard plasmids. And the PCR was positive for flagellin gene. The ultra structure paraespopales bodies indicated a similarity to the typical standard spherical crystal. These study demonstrated the existence of *B. thuringiensis* in Oaxaca, Mexico and it is the first record of these strains mosquitocidas in this state.

Keys words: *Bacillus thuringiensis*, toxicity, bioassay, isolates, spore-crystal

Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad mosquitocida nativas de Oaxaca

I. INTRODUCCIÓN

La aplicación de insecticidas sintéticos durante más de medio siglo, ha ocasionado el desarrollo de resistencia en plagas agrícolas y vectores de enfermedades en humanos. El éxito del uso de insecticidas químicos alta acción residual y toxicidad a amplio espectro de organismos-han ocasionado serios problemas de contaminación y resistencia de los organismos plaga (Van Frankenhuyzen, 1993). Hoy en día existe una necesidad crítica de contar con alternativas amigables con el ambiente y efectivas para el control de plagas (Salehi *et al.*, 2005). Una de las alternativas biológicas más eficaces para el control de mosquitos es el uso de bacterias mosquitocidas como son *Bacillus thuringiensis israelensis* y *Bacillus sphaericus*. Con el presente trabajo se pretende iniciar el desarrollo de la alternativa biológica para el control de mosquitos vectores con bacterias entomopatógenas, iniciando con la búsqueda de cepas con potencial mosquitocida, para su caracterización molecular y biológica.

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (H-14) Barjac, (1978), ha resultado ser un agente eficaz para el control de diferentes especies de mosquitos en Italia (Golbrg y Margalit, 1975); Francia (Barjac, 1978), Checoslovaquia (Vankova y Weiser, 1978); Estados Unidos (García y Des Rochers, 1979); Unión Soviética (Kandivin, 1981) y Brasil (Lacy y Lacey, 1981) y Cuba Dubitsky *et al.*, (1980).

B. thuringiensis es una bacteria Gram positiva, con la capacidad de esporular, aerobia facultativa, nativa del suelo, ampliamente distribuida en el ambiente, perteneciente al orden Eubacteriales, familia Bacillaceae, grupo I del genero *Bacillus* (Porcar y Juárez-Pérez, 2004).

Aún cuando este microorganismo está ampliamente distribuido en el mundo (Martín y Travers, 1989) y existen voluminosas colecciones en diversas instituciones (Padua *et al.*, 1982), es muy baja la probabilidad de aislar una cepa con alta capacidad insecticida.

Con la finalidad de clasificar a las variedades de *B. thuringiensis* se han utilizado métodos como: caracterización bioquímica, patrón de estereasa, sustentabilidad de fagos, serología del cristal (de Barjac y Fachon, 1990), sin embargo, hasta la fecha el método más aceptado para la clasificación de variedades de *B. thuringiensis* es la serotipificación en base al antígeno flagelar-H. Como complemento a esta técnica, existe un amplio abanico de métodos que se han adaptado para la caracterización de cepas de *B. thuringiensis*; como son la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Carozzi *et al.*, 1991), la determinación del perfil de expresión proteica por separación en geles de poliacrilamida mediante electroforesis SDS-PAGE (Chilcott y Wigley, 1993), el análisis del perfil plasmídico (Cinar *et al.*, 2008), entre otros.

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron mediante métodos moleculares cepas obtenidas de muestras de suelo, excremento de ganado, telarañas, etc., las cuales fueron probadas toxicológicamente en larvas del cuarto instar temprano de *Aedes aegypti*, para posteriormente en otra fase de investigación realizar la evaluación de las cepas aisladas con potencial mosquitocida a nivel de campo.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Realizar el aislamiento, caracterización molecular y biológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* de Oaxaca con potencial mosquitocida.

2.2. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar mediante métodos moleculares cepas de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo, excremento de animales, telarañas, etc., procedentes de Oaxaca.
- Determinar la toxicidad de las cepas aisladas de *B. thuringiensis* nativas de Oaxaca sobre larvas de *Aedes aegypti*.
- Determinar la Concentración Letal Media (CL50) de las cepas que presentaron toxicidad hacia *A. aegypti*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva, aeróbica, que presenta flagelos peritricos, con un ancho de 1-1.2 μm y una longitud de 3-5 μm y produce una espora lateral con forma elipsoidal. *B. thuringiensis* tiene la característica de que durante el proceso de esporulación forma un cristal parasporal constituido por una o varias proteínas llamadas Cry, que le confiere capacidad patogénica hacia varios insectos en su mayoría lepidópteros, algunos dípteros y coleópteros. Además de esta toxina, *B. thuringiensis* produce una serie de factores de toxicidad, entre los que se encuentran la proteína Cyt, las proteínas VIP (Proteínas Insecticidas Vegetativas) y la β - exotoxina (Hofte y Whiteley, 1989). El cristal de *B. thuringiensis* se encuentra separado de la espora como se muestra en la (Figura 1), donde se observan ambas estructuras en un esporangio. Esta bacteria se ha aislado de diversas regiones alrededor del mundo (Martín y Travers, 1989) y de una diversidad de ambientes, incluyendo suelo, insectos, depósitos de productos almacenados (Schnepf *et al.*, 1998), y del filoplano (Smith y Couche, 1991); crece en una variedad de medios no selectivos, siendo los más utilizados el caldo nutritivo y el de Luria Bertani (LB). Puede crecer entre 15 y 45°C, pero su temperatura óptima es de 26 a 30°C, pudiéndose producir pérdida de plásmidos a temperaturas mayores de 32°C. En cuanto al pH, crece entre valores de 5.5 y 8.5 con un pH óptimo de 6.5 a 7.5 (Iriarte y Caballero, 2001). En agar nutritivo forma colonias circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro (Iriarte *et al.*, 1999). A diferencia de los virus, hongos y protozoarios entomopatógenos, esta bacteria no se encuentra causando epizootias en las poblaciones de insectos, bajo condiciones naturales (Martín y Travers, 1989). El verdadero papel ecológico de *B. thuringiensis* no está claro, sin embargo, puede considerarse como un entomopatógeno facultativo debido a que sus esporas persisten por un largo tiempo y pueden aun germinar en el suelo y sobre las plantas (de Maagd *et al.*, 2003). Debido a sus propiedades insecticidas *B. thuringiensis* es producido

comercialmente desde 1959, y es considerado como un bioinsecticida seguro por su limitada toxicidad a insectos y la evidencia de no impacto a mamíferos u organismos no blanco. Ha sido utilizado como insecticida biológico en el control de plagas agrícolas y control de vectores de enfermedades, con la utilización de más de 100 productos que han sido desarrollados alrededor del mundo y constituyen cerca del 90% de todos los bioinsecticidas, aunque este tipo de productos todavía supone menos del 2% del mercado total de insecticidas (Roh *et al.*, 2007); así *B. thuringiensis* representa 100 millones de dólares en ventas anuales (Nester *et al.*, 2002).

3.1.1. Taxonomía

La clasificación sistemática de *B. thuringiensis* es la siguiente:

Reino: Procariota

División: Firmicutes

Clase: Firmibacteria

Orden: Eubacteriales

Familia: Bacillaceae

Género: Bacillus

B. thuringiensis pertenece al grupo I del género Bacillus, en donde se encuentran aquellas especies con espora elipsoidal que no provocan hinchamiento en forma bacilar.

Esta especie se relaciona sistemáticamente con otras especies del género Bacillus, como *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. anthracis*, pero se diferencia de ellas por la formación de un cristal proteico en el momento de la esporulación (Schnepf *et al.*, 1998). En el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. anthracis* son catalogadas como especies separadas (Sneath *et al.*, 1986); clasificando a *B. thuringiensis* como una especie argumentando dos rasgos diferenciales: la presencia del cristal paraspopal y sus propiedades insecticidas.

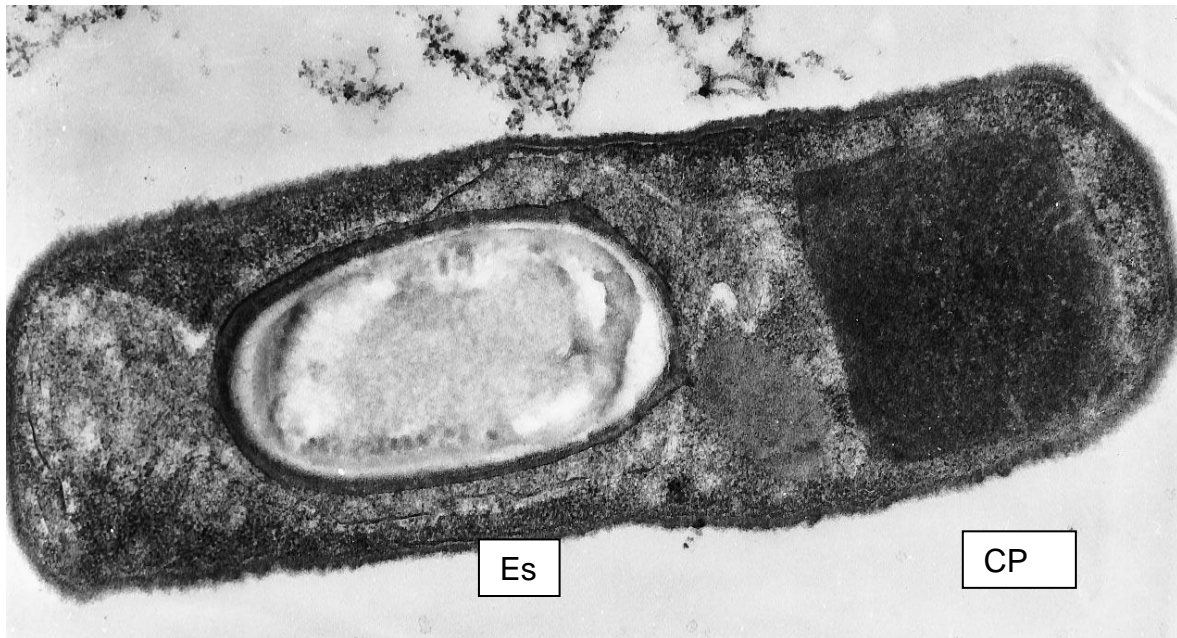


Figura 1. Micrografía de *B. thuringiensis* svar. *thuringiensis* Berliner 1715 durante la esporulación. Es: espora; CP: Cristal paraspopal (Agaisse y Lereclus, 1995).

3.1.2. Historia de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis fue descubierto por Shigetane Ishiwata (1901), en Japón, quien lo aisló a partir de una larva muerta del gusano de seda *Bómbix morí* (L.) denominándolo soto bacillus (“soto” significa muerte súbita en japonés). Sin embargo, Ernst Berliner (1911) aisló un organismo similar de la larva de la palomilla de los graneros *Anagasta kuehniella* (Zeller) en un granero en la provincia de Thuringia (Alemania), de donde toma el nombre, denominándolo *Bacillus thuringiensis* y por el cual Berliner obtuvo el crédito en la clasificación (Whiteley y Schnepf, 1986). En Japón Aoki y Chiasaki (1915) reportaron que la actividad era debido a la presencia de una toxina en los cultivos esporulados, pero no en cultivos jóvenes de células vegetativas y que, dada la inactivación de la toxina por ácidos, fenol, cloruro de mercurio y calor, podría tratarse de una proteína. En Europa durante la primera guerra mundial, el aislado de Berliner se

pierde, pero Mattes (1927) reaisla el mismo organismo a partir del mismo hospedero que Berliner, este aislado de Mattes fue distribuido en laboratorios alrededor del mundo, convirtiéndose en los primeros productos biológicos a base de *B. thuringiensis*. El primer uso de *B. thuringiensis* como bioinsecticida se realizó en 1928 en el sureste de Europa para controlar el barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*). En 1938 la producción comercial de *B. thuringiensis* fue realizada en Francia bajo el nombre de Sporine; desafortunadamente, con el inicio de la segunda guerra mundial la producción cesó (Nester *et al.*, 2002).

Tras la guerra, los mayores progresos y aplicaciones de *B. thuringiensis* se realizaron al otro lado del Atlántico, en Norte América, gracias a las investigaciones de científicos como Steinhaus o Dulmage (Federici, 2005), lo cual llevó al desarrollo y comercialización de Thuricide por parte de Bioferm Co en 1957 (Frankenhuyzen, 1993).

El papel de la inclusión cristalina, en la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis*, fue establecido por Angus (1954), quien demostró que la inclusión cristalina purificada era tóxica para larvas de lepidópteros. Un año más tarde, la naturaleza proteica del cristal fue puesta en evidencia por Hannay y Fitz-James (1955) quienes encontraron que este cuerpo es el resultado de la cristalización de la proteína concluyendo que representa entre el 20 y el 30% de la proteína total después de la lisis celular y la liberación de la espora y los cristales.

Angus, (1956) constató que una suspensión de cristales inyectada directamente en la cavidad hemocélica no era tóxica, emitiendo la hipótesis de que los constituyentes del cristal serian en realidad protoxinas, que necesitan ser activadas por enzimas del tubo digestivo del insecto a fin de liberar el compuesto tóxico. Lecadet y Martouret (1962) demostraron que el contenido intestinal de larvas de la mariposa de la col (*Pieris brassicae*) es capaz de actuar in vitro sobre el cristal para liberar las sustancias tóxicas solubles. Los estudios que siguieron permitieron confirmar la validez de esta hipótesis (Lecadet y Martouret, 1965).

Haward Dulmage (1970), reportó una cepa aislada del gusano rosado del algodónero *Pectinophora gossipyella*, HD-1. Esta cepa pertenece al serovar *kurstaki*, que era de 2 a 200 veces más activa contra plagas agrícolas que los

aislados de *B. thuringiensis* usados en los productos comerciales del momento, al extremo que los laboratorios Abbott lo introdujeron al mercado con el producto Dipel. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de EEUU (EPA) la designó como estándar de potencia o unidad internacional de toxicidad (Frankenhuyzen, 1993).

Hasta 1976 se conocía que *B. thuringiensis* sólo era tóxico contra larvas de lepidópteros, sin embargo, Goldberg y Margalit (1977), aislaron una cepa en el desierto del Negev (Israel). Este aislado representaba un nuevo serotipo (H-14) y se le denominó *B. thuringiensis* svar. *israelensis*, el cual es altamente tóxico a larvas de *Aedes aegypti* (de Barjac, 1978). Posteriormente A. Krieg et al., (1983) aislaron la cepa *tenebrionis* de una larva de *Tenebrio monitor*, la cual resultó altamente tóxica hacia varias especies de coleópteros, principalmente a larvas del crisomélido catarinita de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) (Lambert y Peferoen, 1992). Las serovariedades de mayor impacto a nivel industrial han sido *kurstaki*, *israeliensis* y *morrisoni*, si bien no son las únicas. Desde el descubrimiento e identificación de *B. thuringiensis*, el interés en esta bacteria ha sido cada vez mayor, tanto que a la fecha se han descrito 83 serovariedades distintas según su antígeno flagelar, en el intento de encontrar nuevas toxinas con nuevas actividades biológicas (Lecadet et al., 1999; Khyami-Horani et al., 2003).

Se estima que actualmente existen más de 100 000 aislados distribuidos en colecciones de todo el mundo (Hammond, 2007).

La mayoría de variedades estudiadas actualmente son activas contra larvas de diferentes grupos de lepidópteros, y algunas de ellas también lo son contra dípteros y coleópteros (de Maagd et al., 2001; Whalon y Wingerd, 2003). Algunos estudios han mostrado que *B. thuringiensis* también podría ser utilizado contra insectos de otros órdenes (Hymenoptera, Homoptera y Mallophaga), nemátodos, ácaros y protozoos (Raps et al., 2001; Pinto et al., 2003; Wei et al., 2003).

En los últimos años se han desarrollado ampliamente técnicas moleculares que han permitido manipular genes de *B. thuringiensis* para desarrollar bacterias acuáticas recombinantes que forman parte de la dieta de larvas de insectos (Armengol et al., 2006), así como para generar plantas transgénicas para

conferirles resistencia a los insectos plaga (Romeis *et al.*, 2006). En el año 2002 ya había 14 millones de ha con plantas transgénicas con genes de *B. thuringiensis* (Shelton *et al.*, 2002). Las plantas con genes *Bt* han demostrado que no dañan a otros organismos no blanco y son más seguras que los insecticidas químicos, logrando cosechas más saludables y de menor costo (Federici, 2005).

3.2. Uso de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida

Desde la aparición del primer producto comercial (Sporeine) en Francia en 1938, en el mercado se han desarrollado más de 100 productos basados en *B. thuringiensis*, comprendiendo cerca del 90% de los productos bioinsecticidas. Los biopesticidas *B. thuringiensis* tienen como característica su buena estabilidad ya que no requiere condiciones de almacenamiento importantes; hoy en día (Cuadro 1), existen varios manufacturados de *B. thuringiensis* (Cerón, 2004).

La US Environmental Protection Agency (EPA) requiere que la producción a base de *B. thuringiensis* no presente β - exotoxina (Buitrago, 2004), debido al amplio espectro de acción que presenta ésta, a diferencia de la toxicidad específica de las proteínas Cry. Su producción se efectúa en fermentación semisólida o fermentación sumergida, que es el método de elección donde el proceso transcurre entre 27 y 35°C a un pH de 6.8 a 7.2 bajo una regulación de nutrientes, cinética y transferencia de oxígeno adecuada para una buena recuperación de biomasa y proteína insecticida para su posterior formulación y envase (Buitrago, 2004). Los principales productos están basados en los serovares *kurstaki*, *isrealensis*, *aizawai*, *morrisoni*, *alesti*, *galleriae*, *darmstadiensis*, *dendrolimus* y *sotto* (Glare y O'Callaghan, 2000). La mayoría de los productos están basados en *B. thuringiensis kurstaki* HD1, principalmente por su actividad contra más de 100 especies de lepidópteros.

Los productos a base de *B. thuringiensis* tienen las siguientes ventajas; alta especificidad; inocuidad hacia mamíferos, aves, plantas e insectos benéficos (Schnepf *et al.*, 1998; WHO, 1999); baja persistencia en el ambiente; baja tasa de desarrollo de resistencia por parte de los insectos; compatible con insecticidas

químicos, por lo que se puede mezclar para aumentar su acción y utilizar el equipo estándar para su aplicación (Escriche *et al.*, 2001). Por otro, tiene algunas desventajas; la especificidad se vuelve una desventaja desde el punto de vista agrónomo por su estrecho rango de acción; se inactiva por la luz ultravioleta del sol; y no provoca epizootias, por lo que sus aplicaciones comúnmente deben ser repetitivas.

Los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* se clasifican en:

a) Productos de primera generación: son aquellos productos formulados a base de cepas nativas. Se utiliza una pequeña proporción de todas las proteínas Cry conocidas y corresponden al 84% de los productos registrados. La cepa *kurstaki* HD1 es el ingrediente activo de la mayoría de las formulaciones usadas en el área agrícola. Los productos a base de *B. thuringiensis* *svar. isrealensis* son efectivos contra mosquitos y jejenes, y los productos como Vectobac® y Bactimos® son formulados con esta cepa (Cerón, 2001).

b) Productos de segunda generación: son aquellos que se formulan con una cepa de *B. thuringiensis* a la cual se le introdujo, por conjugación o transformación, genes Cry parentales de una cepa nativa. Condor® es un producto en el cual un plásmido autotransmisible de *aizawa* fue transferido por conjugación a la cepa *kurstaki* (Baum *et al.*, 1999).

c) Productos de tercera generación: se desarrollaron con el fin de resolver la inadecuada aplicación y corta toxicidad residual. Estos productos se han obtenido insertando genes que codifican para toxinas de *B. thuringiensis* en otros microorganismos. El sistema CellCap es un ejemplo, ya que la formulación consiste en bacterias muertas recombinantes. Una cepa no patógena de *Pseudomonas fluorescens* expresa la toxina durante la fase estacionaria de crecimiento y la proteína queda encapsulada en la pared de la bacteria muerta, sistema que fue desarrollado por la compañía Mycogen (Baum *et al.*, 1999).

d) Plantas transgénicas: el desarrollo de la tecnología de transformación ha permitido introducir genes de *B. thuringiensis* en cultivos importantes para el control de plagas específicas. Los genes que le confieren resistencia a insectos se han introducido en cultivos como algodón, maíz, soya, papa, tabaco, caña de

azúcar y alfalfa, entre otros (Jenkins, 1999). En 1995 se aprobó la liberación en campo y comercialización de tres productos: algodón, que expresa la proteína Cry1Ac (Bullgard®, Monsanto); papa, que expresa la toxina Cry3 (Newleaf®, Monsanto); y maíz, que expresa la toxina Cry1Ab (Maximizer®, Novartis). A partir de aquí, se han desarrollado muchos otros productos transgénicos.

Un pesticida biológico con esporas y cristales tiene varios problemas como su efecto retardado, rango estrecho de actividad (cuando se presenta más de un insecto-plaga), poca persistencia en campo (debido a radiación solar, especialmente la UV y alta temperatura) y el que no alcanzan a los insectos que atacan raíces o partes internas del vegetal (Cerón, 2004). Estos inconvenientes se han solucionado con el uso de productos de segunda y tercera generación con cepas que portan más de un gen cry y con la introducción de estos genes en bacterias recombinantes capaces de llegar a tejidos internos como *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* (Turner *et al.*, 1991), que llega al tejido vascular de maíz, o *Pseudomonas* y *Agrobacterium* (Waalwijk *et al.*, 1991) que crecen en la zona de la rizosfera.

Actualmente, existen más de 120 tipos de formulaciones comerciales registradas en más de 60 países, principalmente para el control de lepidópteros, coleópteros y dípteros en agricultura, manejo forestal y control sanitario (Zhou *et al.*, 2005). El espectro de actividad de los productos *Bt* depende fundamentalmente de la δ -endotoxina particular, o combinación de ellas, producida por la cepa de *B. thuringiensis* a partir de la cual se han desarrollado. Otro factor determinante de su actividad y también de su persistencia en el medio es el tipo de formulación utilizada. *B. thuringiensis* (esporas y cristales) es insoluble en agua y se mezcla por emulsión o suspensión. Existen diversos tipos de formulados, como: polvos mojables, concentrados líquidos emulsionables, granulados, “pellets” y “briquettes”, concentrados en spray, cebos y anillos de liberación lenta (Glare y O'Callaghan, 1998). Estos productos pueden incorporar coadyuvantes comunes a insecticidas de síntesis como surfactantes, adherentes, espesantes y ligantes, o productos más específicos como estimulantes alimenticios o protectores de UV.

Cuadro 1. Productos comerciales a base de *B. thuringiensis*.

COMPAÑÍA	NOMBRE COMERCIAL	VARIEDAD	BLANCO*	PROTEINAS
Abbott Labs.	Dipel, Biobit	<i>Kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1, 4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa, 3Aa3, 1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1, β -exotoxina
	Gnatrol	<i>israelensis</i>	D	
	Novodor Xentari	<i>tenebrionis aizawai</i>	C L	
	Dibeta	N.D.	N.D.	
American Cyanamid	Acrobe	<i>Israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
Bactec	Bernan Bt	<i>Kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Biochem Products	Bactmos	<i>Israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
Compagnia di Ricerca chim. CRC	Bactis	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1, 4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa, β -exotoxina
	Bactucide	<i>israelensis</i>	D	
	Exobac	N.D.	N.D.	
Ecogen Inc.	Lepinox (R)	<i>kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ac, 2A, 1F-1Ac (R), 1Ac, 2A, 1C (R), 1Ac, 3A, 3Bb (R), Transconjugante, Transconjugante, 1Ac, 3Aa (T)
	Crymax Raven	ED7826 <i>kurstaki</i>	L C	
	Condor Cutlass (T) Foil	ED7841 <i>kurstaki</i> , EG7673 <i>kurstaki</i> (T), <i>kurstaki</i> (T), <i>kurstaki</i> (T)	L L L/C	
Farbwerke-Hoechst	Biospor	<i>Kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A, 2B
Fermenta ASC Co.	Cutlass	<i>Kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A, 2B
Glavmikrobioprom	Dendrobacillin	<i>dendrolimus</i>	L	N.D.

	Endobacterin Eksotoksin Insektin Toxobakterin	<i>galleriae</i> <i>tolworthi</i> <i>thuringiensis</i> <i>tolworthi</i>	L N.D. L N.D.	1Cb1 β -exotoxina 1Ba1 β -exotoxina
Jewin-Joffe Industry Limeted	Bitayon	N.D.	L	N.D.
Knoll Bioproducts	Larvo-Bt	<i>Kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Korea Explosives	Bt	<i>Kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Kyowa-Hatto Kogyo Co.	Selectgyn	<i>Aizawai</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1
Liebec	Sporine	<i>Kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Merck	Agritol	N.D.	N.D.	N.D.
Mycogen	Mattch	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i> (EC)	L	EC.
	MTrak (R)	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i> (EC)	L	3A (EC)
	MVP (R)	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i> (EC)	C	EC.
		<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i> (EC)		
Phillips Duphar	Bactospeine	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Bactimos	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
Procida	Plantibac	<i>Kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Radonja	Baturad	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Nubilacid	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Sandoz Corp.	Javelin	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Thuricide	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Certan	<i>aizawai</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1
	Teknar	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
	Trident	<i>tenebrionis</i>	C	3 A
Scientific Technology Developing	& Bt 8010, Rijin	N.D.	L	N.D.
SDS Biotech K.K.	Delfin, Thuricide	N.D.	L	N.D.

Thermo Corporation	Trilogy	Able	<i>kurstaki</i>	L	N.D.
		Agree	<i>aizawai</i> -GC91	L	Transconjugante
		Teknar	(T) <i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1,
		Thuricide	<i>kurstaki</i>	L	CytAa
		Javelin, Delfin	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1,
		CoStar	<i>kurstaki</i> -SAH	L	2Aa1, 2Ab1
Tuticorin Chemicals and Fertilisers Limited	Alkali and	Steward	<i>kurstaki</i> -SA12	L	N.D.
		Trident	<i>kurstaki</i>	L	N.D.
			<i>tenebrionis</i>	C	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1 3Aa1
Tuticorin Chemicals and Fertilisers Limited	Alkali and	Spicturin	<i>Galleriae</i>	L	1Cb1

*L: lepidópteros, C: coleopteros, D: dípteros (Cerón, 2004).

3.3. *Ecología y Biología de B. thuringiensis*

B. thuringiensis ha sido considerado un microorganismo del suelo ya que éste era el medio más frecuente a partir del cual se aisló en los estudios iniciales. Sin embargo, los numerosos programas de búsqueda de cepas emprendidos desde entonces han podido aislar esta especie de casi cualquier hábitat, como el suelo, excrementos, superficies vegetales, agua, cadáveres de insectos, granos almacenados (Schnepf *et al.*, 1998), e incluso en ambientes marinos (Baig y Mehnaz, 2009). Por ello, en la actualidad *B. thuringiensis* se considera una especie ubicua. La distribución de *B. thuringiensis* en el medio ambiente también es muy amplia. Tiene la capacidad de ocupar un gran número de ecosistemas terrestres diferentes como desiertos, estepas, bosque húmedo tropical, altas montañas, playas y cuevas entre muchos otros (Ibarra *et al.*, 2003). El papel real que juega esta bacteria en el medio ambiente no es del todo conocido, precisamente debido a la diversidad de nichos ecológicos en los que ha sido hallada. Si bien la capacidad entomopatógena de esta especie le permite colonizar insectos susceptibles y multiplicarse en un medio rico en nutrientes como es el hemocele de los mismos, la aparición de este fenómeno a escala de epizootia es poco habitual en la naturaleza (Schnepf *et al.*, 1998). Además, se ha visto que en

condiciones favorables sus esporas también pueden germinar en otros medios como el suelo y las superficies foliares (de Maagd *et al.*, 2003; WHO, 1999)

El ciclo biológico de *B. thuringiensis* se inicia con la germinación de las esporas. En la naturaleza esto se produce cuando las condiciones ambientales y nutricionales son favorables, generalmente en el hemocele del insecto contaminado y con menor probabilidad en otro tipo de sustratos como en el suelo. La célula crece y se multiplica activamente en condiciones aerobias, aunque es anaerobia facultativa. En condiciones de laboratorio, la bacteria crece convenientemente en diversos medios de cultivo, las condiciones óptimas son 26-30°C de temperatura y pH neutro (Iriarte y Caballero, 2001).

La fase vegetativa de crecimiento finaliza con el empobrecimiento de nutrientes en el medio que da paso a la fase estacionaria de crecimiento en la que se forma la endospora y las inclusiones cristalinas paraesporales características de la especie (Figura 2); en esta fase la célula es denominada esporangio y está compuesta de dos compartimentos: la célula madre y la forespora (Agaisse y Lereclus, 1995), que durante el proceso de maduración se envuelve de dos capas, el córtex al interior y la cubierta al exterior (Ball *et al.*, 2008) (Figura 3). La esporulación y la formación del cristal son favorecidos por la presencia de sales de calcio, magnesio, manganeso, hierro y zinc (Stewart *et al.*, 1981). El ciclo se cierra con la fase lítica, en la que la exospora y los cristales se liberan al medio.

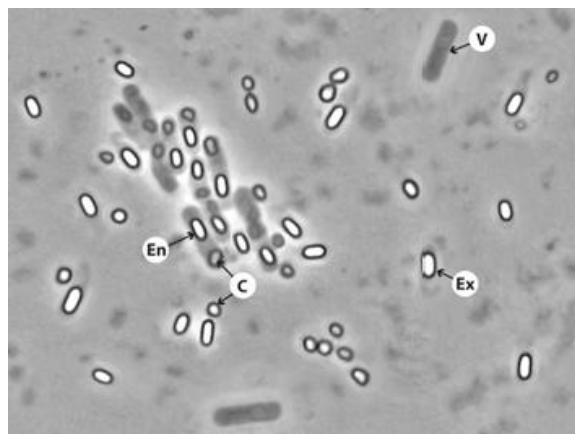


Figura 2. Cultivo de *B. thuringiensis*. V) célula en crecimiento vegetativo; En) endospora; Ex) exospora; C) cristal paraesporal.

Las esporas son estructuras que pueden sobrevivir en un estado metabólicamente inactivo durante largos periodos de tiempo hasta encontrar las condiciones adecuadas para la germinación. Son muy resistentes a condiciones ambientales extremas (deseccación, altas y bajas temperaturas), aunque son altamente sensibles a la radiación UV, pudiendo perder la viabilidad en muy poco tiempo (Joung y Côté, 2000).

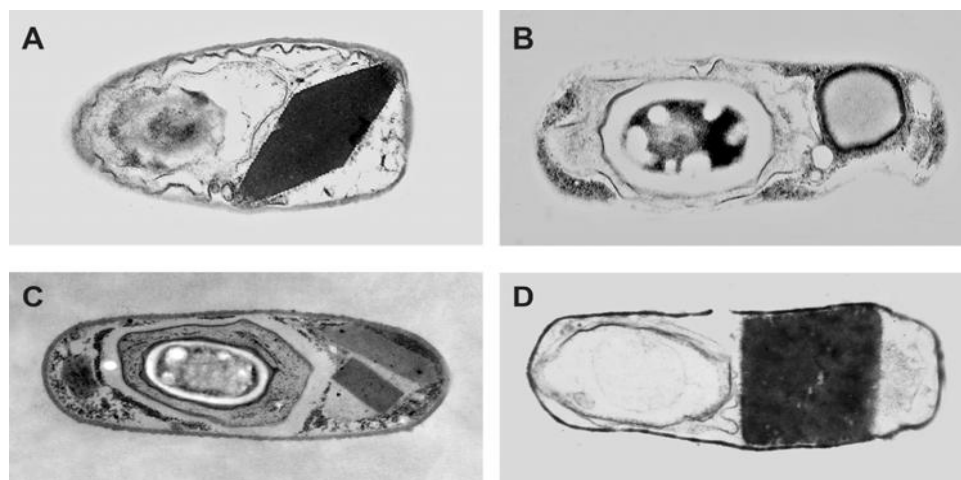


Figura 3. Micrografías electrónicas de *B. thuringiensis* subsp. *sotto* (Wasano et al., 2000) (A), subsp. *sumiyoshiensis* (Wasano et al., 2000) (B), subsp. *morrisoni* (Baum y Malvar, 1995) (C) y una cepa de serotipo no identificado (de Maagd et al., 2001) (D). En todas estas imágenes la endoespora está situada al lado izquierdo del esporangio y el cristal paraesporal al derecho.

Los cristales paraesporales están constituidos fundamentalmente de proteínas llamadas δ -endotoxinas. La gran capacidad de producción de estas proteínas durante la fase estacionaria de crecimiento tiene pocos precedentes en la naturaleza, se estima que estos cristales llegan a suponer hasta un 20-30% del peso seco del esporangio (Baum y Malvar, 1995) y que en laboratorio se puede obtener un rendimiento de 0.5 mg por ml de cultivo (Agaisse y Lereclus, 1995). Esta característica depende en gran medida de la capacidad de estas proteínas

para formar inclusiones cristalinas. En este estado insoluble, las proteínas son menos sensibles a la degradación proteolítica y pueden así acumularse en la célula madre (Baum y Malvar, 1995). Existen varios factores condicionantes de la cristalización de las δ -endotoxinas, como son su estructura secundaria, la formación de puentes disulfuro entre residuos cisteína y la presencia de componentes adicionales en el cristal. Además, los mecanismos de cristalización pueden variar entre las distintas δ -endotoxinas (Agaisse y Lereclus, 1995; Baum y Malvar, 1995).

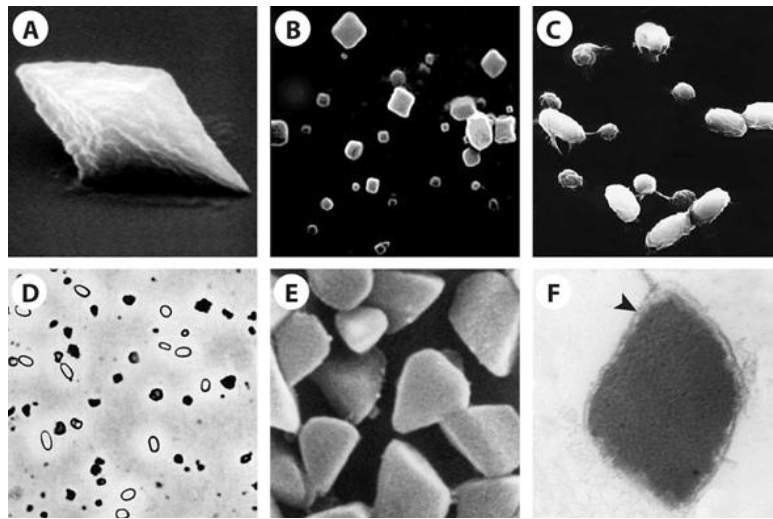


Figura 4. Cristales paraesporales con diferentes morfologías: bipiramidal (A), cúbico y esporas (B) (Ito *et al.*, 2006b), redondeado y esporas (C) (Saitoh *et al.*, 1998), irregular y esporas (D) (Kaelin *et al.*, 1994), poliédrico (E y F) (Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995). La flecha de la figura F indica la membrana envolvente del cristal.

La morfología que adquieren los cristales puede ser muy diversa y normalmente está directamente relacionada con el tipo de δ -endotoxinas que lo componen. Así, los cristales compuestos de Cry1 son bipiramidales (Figuras 4 A), de Cry2 son cúbicos (Figura 4 B), de Cry3A son planos-rectangulares (Figura 4 C) y de cry4 son esféricos u ovoides (Figuras 4 B, 4 C). También existen cristales poliédricos (Figura 4 E) e irregulares (Figura 4 D). Otro rasgo morfológico asociado

a los cristales paraesporales es la existencia de una membrana que envuelve a la inclusión a modo de funda; su presencia o ausencia y su grosor es dependiente de la cepa (Wasano et al., 2000) (Figuras 4 B, 4 F). Como ocurre con las esporas, e incluso de forma más acentuada, los cristales paraesporales son muy sensibles a la radiación UV.

3.4. Factores tóxicos de *Bacillus thuringiensis*

3.4.1. Las δ -endotoxinas

Las δ -endotoxinas, como se ya se ha indicado, son los componentes mayoritarios de los cristales paraesporales de *B. thuringiensis*, además son los principales factores insecticidas de esta especie. Estas proteínas también son denominadas ICPs, por sus siglas del inglés “Insecticidal Crystal Proteins”. Existe una gran diversidad de δ -endotoxinas y, en conjunto, se ha identificado un gran número de especies de insectos susceptibles a su acción, pertenecientes a diversos órdenes (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera y Mallophaga), además de otros invertebrados como nematodos, ácaros y protozoos (de Maagd *et al.*, 2003). Sin embargo, cada δ -endotoxina presenta un espectro de actividad insecticida característico, con un rango de acción limitado a pocas especies, normalmente pertenecientes al mismo orden.

Las δ -endotoxinas están compuestas por dos grupos de proteínas que no presentan homología de secuencia ni de estructura terciaria entre sí, aunque comparten muchas propiedades bioquímicas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt.

3.4.2. Proteínas Cry

Las proteínas Cry se clasificaron en un principio según su especificidad (Höfte y Whiteley, 1989). En esta clasificación las proteínas CryI eran aquellas con

un PM aproximado a 130 kDa, y que presentaban actividad contra lepidópteros; las proteínas CryII eran de 70 kDa, y presentaban actividad contra lepidópteros y dípteros; las proteínas CryIII eran proteínas de 70 o de 130 kDa con actividad contra coleópteros; y las proteínas CryIV con PM de 130 y 70 kDa con actividad contra dípteros. Posteriormente se propusieron dos grupos más, el CryV y CryVI con actividad contra nematodos (Wei *et al.*, 2003). La nomenclatura y clasificación de las proteínas Cry se basa exclusivamente en la similitud entre las secuencias de aminoácidos (Crickmore *et al.*, 1998), y establece toxinas holotipo únicas que se ordenan mediante 3 rangos basados en el grado de divergencia de su secuencia; con los límites entre el primero (número arábigo, familia; ej. Cry11), el segundo (letra mayúscula; ej. Cry11A) y el tercero (letra minúscula; ej. Cry11Aa) de un 45%, 78% y 95% de identidad, respectivamente (Figura 5). Adicionalmente, se incorpora un cuarto rango (otro número arábigo; ej. Cry11Aa1) para indicar aislamientos independientes de un gen holotipo cuyas secuencias son idénticas o difieren ligeramente. Según este criterio, este sistema permite la inclusión de nuevas δ -endotoxinas así como de proteínas cristalinas de alta homología pero que son producidas por especies diferentes a *B. thuringiensis*, como son: Cry16 y Cry17, producidas por *Clostridium bifermentans* (Weinberg y Séguin) (Barloy *et al.*, 1998) y Cry18, por *Bacillus popilliae* (Dutki) (Zhang *et al.*, 1997).

La definición de una proteína Cry propuesta por la nomenclatura de Crickmore *et al.*, (1998), es: una proteína que forme una inclusión paraspopal (cristal) de *B. thuringiensis* que muestre un efecto tóxico verificable experimentalmente o cualquier proteína que muestre similitud en la secuencia con las proteínas Cry conocidas.

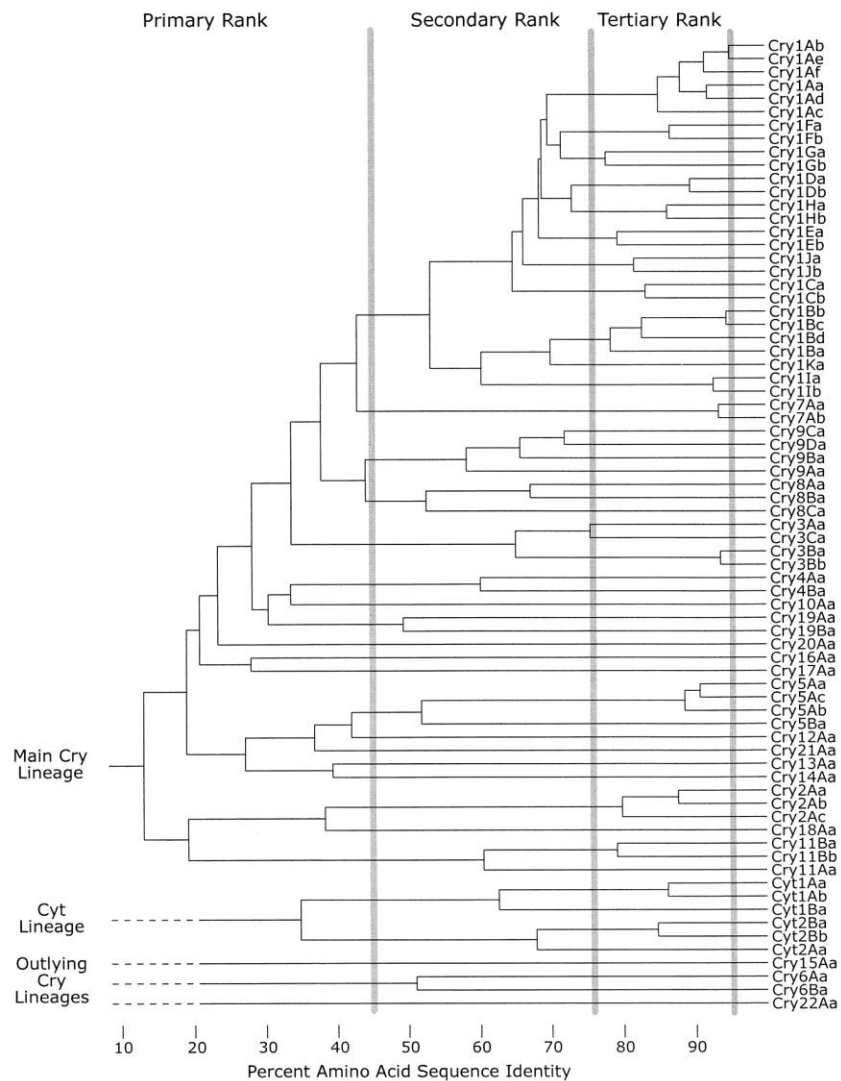


Figura 5. Dendrograma de las δ -endotoxinas Cry (arriba) y Cyt (abajo). Las líneas verticales indican los límites al 45%, 78% y 95% de homología. Fuente: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/

Las δ -endotoxinas tipo Cry son proteínas globulares formadas por 3 dominios estructurales (Bravo *et al.*, 2007). (Figura 6).

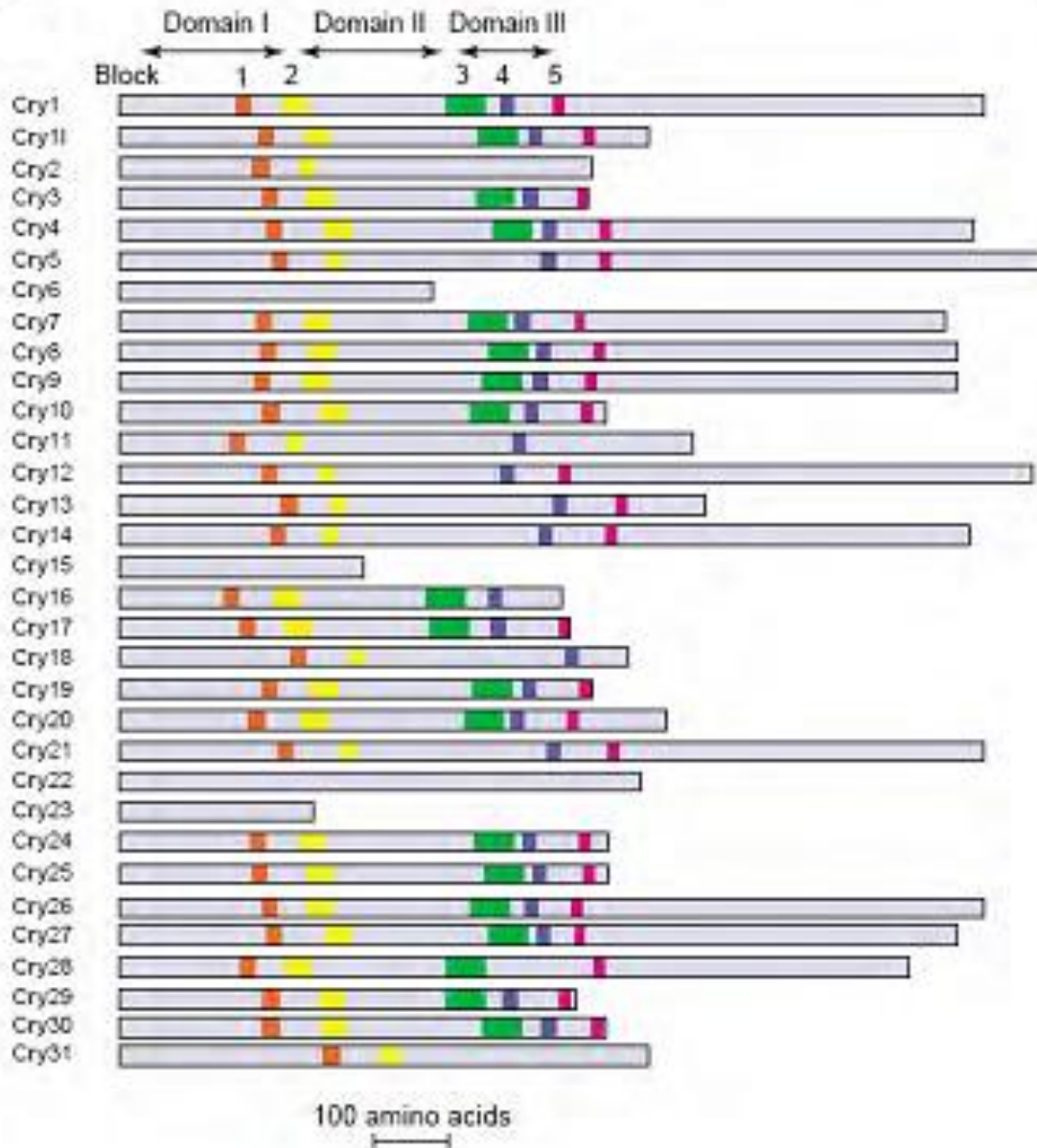


Figura 6. Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry. Longitud relativa de diferentes protoxinas Cry, posición de los cinco bloques conservados (si están presentes) y correspondencia con los dominios I, II y III.

3.4.3. Proteínas Cyt

Las proteínas Cyt son cristalizadas junto con la endotoxina Cry en el cuerpo de inclusión paraspopal.

Las δ -endotoxinas tipo Cyt son exclusivas de algunas cepas de *B. thuringiensis*, sobre todo de subespecies que producen una pequeña endotoxina citolítica de 25-28 kDa, que se conocen como la toxina Cyt1A de *B. thuringiensis* srvar. *israelensis* y *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* PG14 y la toxina Cyt2 de *B. thuringiensis* srvar. *kyushuensis* activas contra dípteros (Promdonkoy *et al.*, 2008), y se componen de dos familias altamente relacionadas, Cyt1 y Cyt2 (Crickmore *et al.*, 1998) (Figura 5). El alineamiento de la estructura primaria de las toxinas Cyt refleja 4 bloques conservados que son clave en la determinación de la estructura y la función de la toxina (Butko, 2003). El interés que presentan estos bloques conservados es el diseño de un par o varios oligonucleótidos universales que pueden amplificar por PCR genes conocidos y nuevos (Ibarra, 2005). Hasta el momento se ha obtenido la estructura tridimensional de 2 toxinas Cyt: Cyt2Aa (Li *et al.*, 1996) y Cyt2Ba (Cohen *et al.*, 2008).

3.5. Modo de acción de las toxinas Cry

La transformación de las proteínas Cry de protoxinas cristalizadas relativamente inertes a formas citotóxicas en un proceso complejo que consta de varias etapas (Schnepf *et al.*, 1998).

Los cristales de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* deben ser ingeridos por el insecto para ser efectivos. El cristal permanece prácticamente intacto hasta llegar al intestino medio, donde ejercerá su actividad. Allí las condiciones del medio posibilitan la solubilización del cristal y la liberación de las protoxinas. El factor determinante en este proceso es el pH; si el pH del lumen intestinal no es el adecuado, los cristales no se solubilizarán y por lo tanto no ejercerán su actividad. El pH óptimo de solubilización depende la composición del cristal. La gran mayoría de las protoxinas Cry se solubilizan eficientemente a pH alcalino, como el existente en el tracto intestinal de lepidópteros y la mayoría de dípteros

susceptibles a *B. thuringiensis* (Bravo *et al.*, 2007). Sin embargo, los cristales compuestos de protoxinas de la familia Cry3 se solubilizan mejor a pH neutro o ligeramente ácido, condiciones que coinciden con las existentes en el intestino medio de los coleópteros, los insectos susceptibles a este tipo de toxinas (Oppert, 1999).

Conviene destacar que la mayor parte de la información sobre el modo de acción de las proteínas cristalinas se ha obtenido de estudios con larvas de lepidópteros (Schnepf *et al.*, 1998), por lo que algunas características podrían ser específicas de este orden de insectos. Los cambios observados en el insecto y el tiempo de intoxicación varían dependiendo de las proteínas cristalinas y de las especies afectadas. A nivel macroscópico se observa en general, que durante la primera hora de haber ingerido el alimento tratado con proteína cristalina, el insecto deja de alimentarse. Dentro de la segunda hora, el insecto va reduciendo su movilidad, llegando a paralizarse en unas 6 horas o menos, dependiendo de la dosis de la proteína cristalina ingerida. A nivel microscópico las células intestinales pierden su estructura progresivamente. Las microvellosidades desaparecen y el retículo endoplásmico y las mitocondrias se desintegran gradualmente. Las células se vacuolizan e hinchan y algunas se desprenden de la membrana basal del tejido. Finalmente, las células afectadas se lisan (Martínez-Ramírez *et al.*, 1999). (Figura 7).

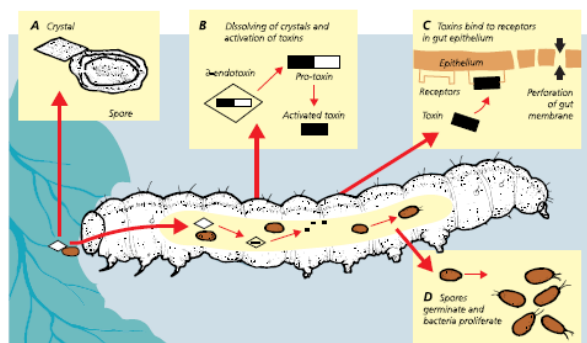


Figura 7. Esquema del modo de acción del complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* en larvas susceptibles. En a) el insecto susceptible ingiere esporas y cristales de Bt; b) los cristales se disuelven debido al pH extremo del sistema digestivo del insecto, esto libera las protoxinas, que son posteriormente activadas por proteólisis por distintas enzimas del insecto; c) las toxinas se unen a receptores específicos del epitelio

intestinal y favorecen la formación de poros, lo que permite el intercambio de iones y la neutralización del pH del intestino medio; d) las condiciones de pH neutro favorecen la germinación de las esporas y la colonización del insecto hospedero por *Bt* y otras bacterias oportunistas. Tomado y modificado de WHO, 1999.

Las protoxinas liberadas al lumen intestinal no son tóxicas por sí mismas, deben ser activadas por la acción de los enzimas proteolíticos (proteasas) del insecto. Las proteasas mayoritarias en el intestino de lepidópteros y dípteros son del tipo serín-proteasa (tripsinas y quimotripsinas) y aunque existen otros tipos de proteasas que pueden participar en la activación de las protoxinas Cry, éstas son las determinantes (Díaz-Mendoza *et al.*, 2007). El proceso de activación es secuencial, de forma que se producen una serie de polipéptidos intermedios hasta obtenerse la toxina activa resistente a proteasas, este proceso es dependiente del tipo de protoxina y del complejo de proteasas presente. En el caso de las protoxinas de 130-140 kDa, la digestión comienza en el extremo C-terminal y progresa en varios pasos hasta degradar la mitad C-terminal de la protoxina (unos 500 aa), dando lugar a un polipéptido de 60-70 kDa (Figura 8).

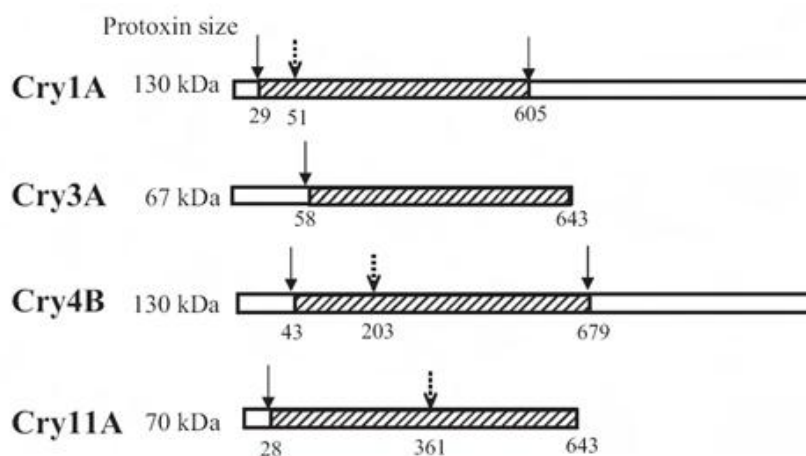


Figura 8. Longitud relativa de diferentes protoxinas Cry y sitio de corte por proteasas. Los cuadros blancos representan la protoxina mientras que los cuadros a rayas indican la longitud de la toxina activada. Las flechas enteras muestran los sitios de corte en los extremos N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) que dan lugar a la toxina activada. Las flechas punteadas indican sitios de corte intramoleculares en la toxina activada. Fuente: (Bravo *et al.*, 2007).

Las toxinas cortas, como Cry2, Cry3 y Cry11, en cambio, no son procesadas en su extremo C-terminal, por ello han sido consideradas productos truncados naturales de las toxinas de mayor tamaño (Höfte y Whiteley, 1989). Por otra parte, todas las protoxinas estudiadas sufren degradación proteolítica en su extremo N-terminal, liberando normalmente un pequeño péptido de no más de 60 aa, dependiendo de la protoxina (Figura 8).

B. thuringiensis produce proteasas intracelulares endógenas, especialmente al inicio de la fase de esporulación y formación del cristal (Oppert, 1999). Estas proteasas pueden hidrolizar parcialmente las protoxinas recién sintetizadas (Rukmini *et al.*, 2000) o incluso procesarlas ya en el cristal (Dai y Gill, 1993). Es más, en algunos casos se ha descrito la presencia de proteasas en el cristal paraesporal (Kumar y Venkateswerlu, 1997). Además, se ha demostrado que el preprocesamiento de las protoxinas mediante proteasas endógenas puede tener implicaciones en la especificidad de la toxina (Kumar y Venkateswerlu, 1998).

Como se ha mencionado, la activación proteolítica es un proceso que depende de la fuente de proteasas. Algunas proteasas comerciales, así como extractos intestinales de diferentes especies de insectos (Lightwood *et al.*, 2000) e incluso extractos de larvas en diferentes estadios de desarrollo (Keller *et al.*, 1996) pueden dar lugar a patrones de degradación y a toxinas activadas diferentes, y esto puede repercutir en la toxicidad y especificidad de las mismas (Haider *et al.*, 1986). De hecho, uno de los mecanismos de resistencia que desarrollan los insectos frente a *B. thuringiensis* consiste en alterar la activación de sus protoxinas (Ferré y Van Rie, 2002).

Para ejercer su función en la pared del epitelio intestinal, las toxinas activas deben atravesar la membrana (o matriz) peritrófica (MP), que se localiza entre el lumen intestinal y la membrana apical de las células epiteliales y está compuesta por un entramado de fibras de quitina en capas unidas por glicoproteínas (Hegedus *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que las toxinas activadas pueden ser interceptadas al interactuar con los residuos azucarados de las glicoproteínas de la MP (Campbell *et al.*, 2008). La estructura y composición de la MP puede variar mucho entre

especies de un mismo orden de insectos y se ha planteado que éste puede ser un factor a tener en cuenta en la resistencia a las toxinas Cry (Rees *et al.*, 2009).

Tras atravesar la membrana peritrófica las toxinas se unen específicamente a moléculas situadas en la cara apical de las microvellosidades del epitelio intestinal, en concreto a las membranas en borde de cepillo de las células epiteliales (Schnepf *et al.*, 1998). Estudios llevados a cabo sobre la cinética de la unión toxina-membrana permitieron determinar que existen dos fases en este proceso, la primera en la que la unión era reversible y la segunda, irreversible (Liang *et al.*, 1995). La visión actual del fenómeno establece que la fase reversible se correlaciona con la unión a la membrana, mientras que la irreversible se corresponde directamente a la inserción de la toxina en la membrana, y por tanto a la toxicidad (Pigott y Ellar, 2007). Este tipo de estudios han mostrado que en el intestino del insecto susceptible existen sitios de unión de la toxina altamente específicos. Dichos sitios de unión son principalmente proteínas de membrana, con funciones celulares concretas independientes del proceso patogénico, para las cuales *B. thuringiensis* ha evolucionado produciendo toxinas de alta afinidad. Por ello, estas moléculas son conocidas como “receptores”.

No existe consenso sobre los pasos finales del mecanismo de acción relativos a la interacción de la toxina activa con los receptores intestinales y la ejecución de su efecto citotóxico. Varios grupos han llevado a cabo investigaciones con la finalidad de explicar el mecanismo de acción y resistencia de las proteínas Cry, obteniendo evidencias que fortalecen la hipótesis de formación de poro. Este modelo ha sido propuesto por la Dra. Alejandra Bravo (UNAM, México) (Bravo *et al.*, 2007; Soberón *et al.*, 2009) y es una actualización del modelo propuesto por Knowles y Ellar (1987). El modelo propone que tanto los receptores de tipo cadherina como la aminopeptidasa-N (APN) son necesarios para la toxicidad plena de la toxina, de forma que el proceso sería secuencial (Figura 9): A) los monómeros de la toxina activa se unen inicialmente a cadherinas (unión reversible), esta interacción conduce a un cambio conformacional de la toxina que facilita el corte de la hélice α -1 por proteasas situadas en la membrana; B) en este estado la toxina se oligomeriza formando un tetrámero, la estructura

“pre-poro”, que muestra alta afinidad por las APNs (unión irreversible), entonces la APN conduce el pre-poro a las regiones de membrana denominadas balsas lipídicas, que facilitan la inserción del oligómero en la membrana, mediada por la acción de los dominios I, y la formación del poro. C) La acumulación de estos poros en la membrana apical del epitelio provoca una alteración drástica del potencial de membrana y el equilibrio osmótico, que fuerza la entrada de agua en la célula, ésta se hincha y se lisa.

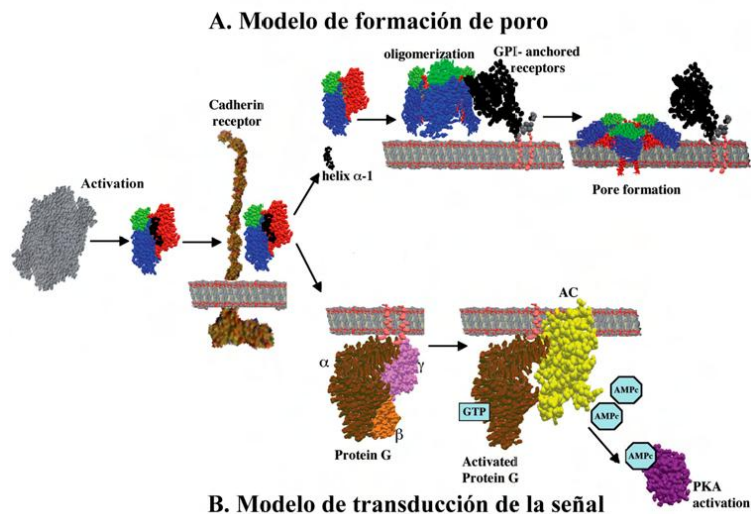


Figura 9. Esquema de 2 modelos de acción de las toxinas Cry: A. Modelo de formación de poro (arriba) y B. Modelo de transducción de la señal (abajo). Ambos modelos comparten las fases iniciales: solubilización de las protoxinas (no ilustrada), activación y unión a receptores tipo cadherina en membrana. Fuente: (Soberón *et al.*, 2009).

3.6. Modo de acción de las toxinas Cyt

Las proteínas Cyt comparten las fases iniciales de su mecanismo de acción con las proteínas Cry; al igual que éstas, se sintetizan y cristalizan en forma de protoxinas (de un tamaño de 24-27 kDa) y para adquirir su forma activa (22-25 kDa) deben ser solubilizadas bajo las condiciones de alcalinidad del tracto intestinal del insecto y sufrir la proteólisis de pequeños péptidos a ambos extremos de la protoxina (Cohen *et al.*, 2008). Como las toxinas Cry, las toxinas Cyt

activadas atraviesan la membrana peritrófica y alcanzan la pared intestinal donde causarán la lisis osmótica de las células epiteliales. No obstante, el mecanismo por el cual lo hacen es completamente diferente, ya que las toxinas Cyt no precisan de receptores proteicos sino que interactúan directamente y de una forma poco específica con la fracción lipídica de la membrana, en concreto con fosfolípidos cuya cabeza polar es de tipo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o esfingomielina y que tienen cadenas de ácidos grasos insaturados (Thomas y Ellar, 1983). El conocimiento del mecanismo no es completo y se han propuesto dos modos de acción: A) el “modelo de formación de poro”, que sugiere que las toxinas Cyt se insertan en la membrana como monómeros y cuando se alcanza una cierta densidad, éstos se oligomerizan conformando poros de membrana (Promdonkoy *et al.*, 2008); y B) el “modelo de acción tipo detergente”, según el cual las toxinas Cyt se agregan de forma poco específica sobre la superficie de la membrana plasmática alterando su estructura o incluso destruyéndola, de forma similar a un detergente (Butko, 2003; Manceva *et al.*, 2005).

El espectro de actividad de las toxinas Cyt *in vivo* está restringido principalmente a dípteros (Bravo *et al.*, 2007), aunque bajo ciertas condiciones también han mostrado actividad sobre alguna especie de coleóptero (Federici y Bauer, 1998) y lepidóptero (Sayyed *et al.*, 2001).

Uno de los aspectos más estudiados de las toxinas Cyt es su capacidad sinérgica al combinarlas con otras toxinas Cry, en especial con las toxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) sobre mosquitos (Wirth *et al.*, 2007).

3.7. Resistencia a *Bacillus thuringiensis*

La habilidad de los insectos para sobreponerse y adaptarse al estrés ambiental hace que los métodos de control se vuelvan ineficientes, como sucede con el uso excesivo de algunos plaguicidas.

Hasta el momento aparecen pocos informes de resistencia a *B. thuringiensis*. El primer caso probado de resistencia a *Bt* fue el reportado en la palomilla de los graneros, *Plodia interpunctella* (McGaughey, 1985). Se cree que

esto fue motivado por las condiciones de granero, las cuales permiten mantener activo al producto por un período más largo y de esta forma, efectuar una presión de selección más duradera. Otro caso documentado sobre el desarrollo de resistencia a *Bt* es el de la palomilla dorso de diamante, *Plutella xylostella* en repollo en Asia (Tabashnik *et al.* 1991). A pesar de que existen otros casos, éste es el único que se ha desarrollado bajo condiciones de campo, debido a un uso inmoderado de bioinsecticidas a base de *Bt*. Los otros casos (mosquitos, catarinita de la papa, otros lepidópteros) se han desarrollado bajo condiciones de laboratorio. Afortunadamente, el desarrollo de resistencia hacia *Bt* es rápidamente reversible cuando se elimina la presión de selección de la toxina (Ibarra y López-Meza 1997; Ferré y Van Rie 2002).

3.8. Identificación y caracterización de variedades de *Bacillus thuringiensis*

Debido al uso de *B. thuringiensis* como bioinsecticidas y su trascendencia económica, la caracterización de los aislados nos permite diferenciarlos y establecer su originalidad, por lo que se han desarrollado procedimientos para el estudio y caracterización de aislados.

Uno de los objetivos más grandes que persigue la caracterización de esta bacteria es la búsqueda de nuevos genes que codifiquen proteínas de mayor potencia insecticida o con nuevos espectros de acción (Porcar y Juárez-Pérez, 2003).

3.8.1. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se basa en el tamaño y forma que presenta el cristal paraspopal. La presencia o ausencia del cristal es el principal criterio para identificar un aislado de *B. thuringiensis*. La morfología del cristal en algunos casos refleja el tipo de especificidad insecticida, aunque la clasificación en base al tipo de cristal es compleja y poco aplicable, ya que la mayoría de los aislados

presentan un cristal bipiramidal o bien, esférico. Pero es una característica importante dentro de la caracterización de un aislado (Aronson *et al.*, 1986).

La nomenclatura oficial de los cristales fue propuesta por Heimpel (1967), la cual designa las diferentes toxinas producidas por *B. thuringiensis* e introduce el término de δ -endotoxina o proteínas del cristal insecticida y actualmente se utiliza este término para designar el cristal proteico, la molécula de protoxina o la toxina activada.

A) Cristal bipiramidal. Cerca del 40% de las cepas de referencia producen un cristal con morfología típica bipiramidal, por lo que es más abundante y hasta 1977 era el único tipo de morfología conocida. Este tipo de cristal presenta un rango de toxicidad que afecta típicamente a los lepidópteros. Frecuentemente estos cristales contienen otros cristales incrustados de forma cubica, ovoide o redonda, como se observa en algunas cepas de serovares *kurstaki*.

B) Cristal amorfo. Un porcentaje menor de cepas de *B. thuringiensis* presenta un cristal de ovoide a esférico (5% de 42 nuevos serovares) y es un tipo de morfología estrechamente relacionado a *B. thuringiensis* serovar *israelensis*, por lo que presenta un espectro de acción tóxico hacia dípteros.

C) Cristal cuadrangular aplanado. Este tipo de cristal típico del *B. thuringiensis* serovar *morrisoni* cepas tenebrionis y *san diego* (que Krieg *et al.*, 1987 consideran la misma cepa). Este tipo de cristal presenta toxicidad hacia algunos coleópteros. De los 42 nuevos serovares analizados por Lecadet *et al.*, (1999) solo un serovar muestra esta morfología.

D) Cristales atípicos. Una gran cantidad de cepas presentan una morfología atípica, es decir, diferente de las mencionadas arriba, y varían en forma y tamaño.

3.8.2. Caracterización serológica (Serotipificación)

La serotipificación es una técnica que permite clasificar las variedades de *B. thuringiensis* en diferentes serovariedades o serovares. El antígeno flagelar H ha sido usado para caracterizar *B. thuringiensis* desde 1962 (de Barjac y Bonnefoi,

1962). Los aislamientos de *B. thuringiensis* son incubados con anticuerpos policlonales de cepas conocidas, los cuales reconocen los antígenos flagelares del bacilo, dándose una reacción de aglutinación específica. Cada serovar incluye el conjunto de aislados que tienen en común el factor antigénico presentes en la proteína del flagelo. En ocasiones el flagelo contiene más de un factor antigénico, por lo que existen aislados que comparten alguno de ellos, presentando también otros que le son excluidos. Los serovares que comparten al menos uno de estos factores forman un serotipo. Cuando un aislado se hace reaccionar con la colección de antisueros de las diferentes cepas tipo, la reacción cruzada indicará que pertenece al serotipo-H al cual pertenece el suero con el que reaccionó su flagelina. Cuando se encuentra un aislado que no reacciona con los antisueros conocidos, se obtiene su correspondiente antisuero y se registra como un nuevo serotipo en la colección del Centro Internacional de Bacillus Entomopatógenos (IEBC, por sus siglas en inglés) del Instituto Pasteur en París, Francia. Actualmente se conocen 83 serovariedades (Lecadet *et al.*, 1999; Khyami-Horani *et al.*, 2003) más el reciente descubierto serovar jordanica (H71) (Khyam-Horani *et al.*, 2003). Sin embargo, existen algunos trabajos en los que se concluye que no existe una relación clara entre la clasificación por la técnica del antígeno flagelar y las clasificaciones filogenéticas elaboradas mediante marcadores moleculares (Helgason *et al.*, 2000). De todas formas esta técnica sigue considerándose como la única herramienta disponible para identificar las distintas serovariedades de *B. thuringiensis* (Lecadet *et al.*, 1999).

Cuadro 2. Lista de serovariedades tipo de *Bacillus thuringiensis* registrados en el Centro Internacional de Bacillus Entomopatógenos del Instituto Pasteur (París Francia).

Antígeno H	Serovar	Abreviatura	Primera mención y/o descripción válida
1	<i>thuringiensis</i>	THU	Berliner 1915 ⁺ ; Heimpel y Angus 1958
2	<i>finitimus</i>	FIN	Heimpel y Angus 1958
3a, 3c	<i>alesti</i>	ALE	Toumanoff y Vago 1951; Heimpel y Angus 1958
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	KUR	de Barjac y Lemille 1970

3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	SUM	Ohba y Aizawa 1989
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	FUK	Ohba y Aizawa 1989
4a, 4b	<i>sotto</i>	SOT	Ishiwata 1905 ; Heimpel y Angus 1958
4a, 4c	<i>kenyae</i>	KEN	Bonnefoi y de Barjac 1963
5a, 5b	<i>galleriae</i>	GAL	Shvetsova 1959 ⁺ ; de Barjac y Bonnefoi 1962
5a, 5c	<i>canadensis</i>	CAN	de Barjac y Bonnefoi 1972
6	<i>entomocidus</i>	ENT	Heimpel y Angus 1958
7	<i>aizawai</i>	AIZ	Bonnefoi y de Barjac 1963
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	MOR	Bonnefoi y de Barjac 1963
8a, 8c	<i>ostrinae</i>	OST	Ren <i>et al.</i> 1975
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	NIG	Weiser y Prasertphon 1984
9	<i>tolworthi</i>	TOL	Norris 1964 ; de Barjac y Bonnefoi 1968
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	DAR	Krieg de Barjac y Bonnefoi 1968
10a, 10c	<i>londrina</i>	LON	Arantes <i>et al.</i> (no publicado)
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	TOU	Krieg 1969
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	KYU	Ohba y Aizawa 1979
12	<i>thompsoni</i>	THO	de Barjac y Thompson 1970
13	<i>pakistani</i>	PAK	de Barjac, Cosmao Dumanoir, Shaik y Viviani 1977
14	<i>israelensis</i>	ISR	de Barjac 1978
15	<i>dakota</i>	DAK	De Lucca, Simonson y Larson 1979
16	<i>indiana</i>	IND	De Lucca, Simonson y Larson 1979
17	<i>tohokuensis</i>	TOH	Ohba, Aizawa y Shimizu 1981
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	KUM	Ohba, Ono, Aizawa y Iwanami 1981
18a, 18c	<i>yosoo</i>	YOS	Lee, H. H <i>et al.</i> 1995
19	<i>tochigiensis</i>	TOC	Ohba, Ono, Aizawa y Iwanami 1981
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	YUN	Wan-Yu, Qi-Fang, Xue-Ping y You-Wei 1979 ⁺
20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	PON	Rajagopalan <i>et al.</i> (no publicado)
21	<i>colmeri</i>	COL	De Lucca, Palmgren y de Barjac 1984
22	<i>shandongiensis</i>	SHA	Wang Ying <i>et al.</i> 1986
23	<i>japonensis</i>	JAP	Ohba y Aizawa 1986

24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	NEO	Rodriguez-Padilla <i>et al.</i> 1988
24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	NOV	Burtseva, Kalmikova <i>et al.</i> 1995
25	<i>coreanensis</i>	COR	Lee H. H <i>et al.</i> 1994
26	<i>silo</i>	SIL	de Barjac y Lecadet (no publicado)
27	<i>mexicanensis</i>	MEX	Rodriguez-Padilla y Galan-Wong (no publicado)
28a, 28b	<i>monterrey</i>	MON	Rodriguez-Padilla <i>et al.</i> (no publicado)
28a, 28c	<i>jegathesan</i>	JEG	Seleena, Lee, H. L. y Lecadet 1995
29	<i>amagiensis</i>	AMA	Ohba (no publicado)
30	<i>medellin</i>	MED	Orduz, Rojas, Correa, Montoya y de Barjac 1992
31	<i>toguchini</i>	TOG	Hodirev (no publicado)
32	<i>cameroun</i>	CAM	Jacquemard 1990 ² ; Juarez-Perez <i>et al.</i> 1994
33	<i>leesis</i>	LEE	Lee H. H <i>et al.</i> 1994
34	<i>konkukian</i>	KON	Lee H. H <i>et al.</i> 1994
35	<i>seoulensis</i>	SEO	Lee H. H <i>et al.</i> 1995
36	<i>malaysiensis</i>	MAL	Ho (no publicado)
37	<i>andaluciensis</i>	AND	Aldebis, Vargas-Osuna y Santiago-Alvarez 1996
38	<i>oswaldocruzi</i>	OSW	Rabinovitch <i>et al.</i> 1995
39	<i>brasiliensis</i>	BRA	Rabinovitch <i>et al.</i> 1995
40	<i>huazhongensis</i>	HUA	Dai Jingyuan <i>et al.</i> 1996
41	<i>sooncheon</i>	SOO	Lee H. H <i>et al.</i> 1995
42	<i>jinghongiensis</i>	JIN	Li Rong Sen <i>et al.</i> (en impresión)
43	<i>guiyangiensis</i>	GUI	Li Rong Sen <i>et al.</i> (en impresión)
44	<i>higo</i>	HIG	Ohba <i>et al.</i> 1995
45	<i>roskildiensis</i>	ROS	Hinrinschen, Hansen y Daamgaard (no publicado)
46	<i>chanpaisis</i>	CHA	Chanpaisaeng (no publicado)
47	<i>wratislaviensis</i>	WRA	Lonc <i>et al.</i> 1997
48	<i>balearica</i>	BAL	Caballero <i>et al.</i> (no publicado)
49	<i>muju</i>	MUJ	Seung Hwan Park <i>et al.</i> (no publicado)
50	<i>navarrens</i>	NAV	Caballero <i>et al.</i> (no publicado)
51	<i>xiaguangiensis</i>	XIA	Jian Ping Yan (no publicado)

52	<i>Kim</i>	KIM	Kim <i>et al.</i> (no publicado)
53	<i>asturiensis</i>	AST	Aldebis, Vargas-Osuna y Santiago-Alvarez 1996
54	<i>poloniensis</i>	POL	Damgaard <i>et al.</i> (no publicado)
55	<i>palmanyolensis</i>	PAL	Santiago-Alvarez <i>et al.</i> (no publicado)
56	<i>rongseni</i>	RON	Li Rong Sen (en impresión)
57	<i>pirenaica</i>	PIR	Caballero <i>et al.</i> (no publicado)
58	<i>argentiniensis</i>	ARG	Campos-Dias <i>et al.</i> (no publicado)
59	<i>iberica</i>	IBE	Caballero <i>et al.</i> (no publicado)
60	<i>pingluonsis</i>	PIN	Li Rong Sen (en impresión)
61	<i>sylvestriensis</i>	SYL	Damgaard (no publicado)
62	<i>zhaodongensis</i>	ZHA	Li Rong Sen (en impresión)
63	<i>bolivia</i>	BOL	Ferré-Manzanero <i>et al.</i> (no publicado)
64	<i>azorensis</i>	AZO	Santiago-Alvarez <i>et al.</i> (no publicado)
65	<i>pulsiensis</i>	PUL	Khalique F. y Khalique A. (no publicado)
66	<i>graciosensis</i>	GRA	Santiago-Alvarez <i>et al.</i> (no publicado)
67	<i>vazensis</i>	VAZ	Santiago-Alvarez <i>et al.</i> (no publicado)
68	<i>thailandensis</i>	THA	Chanpaisaeng <i>et al.</i> (no publicado)
69	<i>pahangi</i>	PAH	Seleena y Lee H. L. (no publicado)
70	<i>sinensis</i>	SIN	(no publicado)
71	<i>jordanica</i>	JOR	Khyam-Horani <i>et al.</i> , 2003

(Lecadet *et al.* 1999).

3.8.3. Caracterización toxicológica y patotipos

La caracterización toxicológica se basa en bioensayos para conocer si una cepa es tóxica o no y para cuantificar el grado de toxicidad. Es recomendable que en el bioensayo se incluyan las cepas estándar *kurstaki*, *israelensis* y *tenebrionis*, si los organismos a prueba pertenecen a los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera, respectivamente.

Antes del descubrimiento del serovar *israelensis* y de la cepa *tenebrionis*, solo se conocían especies de *B. thuringiensis* tóxicas a lepidópteros, pero con estas nuevas cepas, se caracterizó a los aislados en tres patotipos:

A) Patotipo I. Son aquellas cepas con actividad tóxica a larvas de lepidópteros, con un cristal típico bipiramidal. (Serovar *kurstaki*)

B) Patotipo II. Son aquellas cepas con actividad contra dípteros (mosquitos y jejenes), con un cristal típico amorfo u ovoide, siendo la cepa tipo el serovar *israelensis*.

C) Patotipo III. Cepas activas contra larvas de coleópteros, con el típico cristal cuadrangular plano, siendo la cepa tipo el serovar *tenebrionis*.

Actualmente esta clasificación está un poco en desuso ya que, por una parte, ciertas cepas tienen actividad tóxica contra más de un orden de insectos. Cepas del serovar *israelensis*, típicas del patotipo II, presentan actividad contra la broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Scolitydae) (Méndez *et al.*, 2003).

Para la comparación entre aislados y toxinas, se designaron cepas “estándar” para usarlas en los experimentos de *B. thuringiensis*. Dulmage en 1975 preparó el estándar HD-1-1971 del serovar *kurstaki*, al cual le fue asignado una potencia de 18,000 UI/mg. Posteriormente, al terminarse éste, se adoptó otro estándar, el HD-1-1980 con una actividad de 16,000 UI/mg.

Tres estándares fueron utilizados para *B. thuringiensis* serovar *israelensis*; IPS-78, IPS-82 y HD-968-1983, la potencia de este último fue asignada en 4740 UI/mg contra la larva de *Aedes aegypti*.

3.8.4. Caracterización genética

La caracterización genética de basa principalmente en la identificación y caracterización de los genes codificadores de las δ -endotoxinas (Höfte y Whiteley, 1989) y en el contenido de plásmidos obtenidos en geles de agarosa (González y Carlton, 1982). El estudio de los genes cry se realiza comúnmente por amplificación por PCR, identificando a los diferentes genes por medio de iniciadores específicos, para determinar la presencia o ausencia de los genes

específicos, así como la amplificación de un gen de un tamaño no esperado (Porcar y Juárez-Pérez, 2003).

También la determinación del perfil de plásmidos ha sido utilizada en el estudio de la localización de genes *cry* (Kronstad *et al.*, 1983), en estudios de transferencia de plásmidos (Aronsohn y Beckman, 1987), en la comparación de aislados relacionados (Ibarra y Federici, 1987) y de manera más frecuente se está utilizando como un método adicional en la caracterización de nuevas cepas (Iriarte *et al.*, 2000) y estudios de diversidad de aislados de *B. thuringiensis* (Vilas-Boas y Lemos, 2004). El perfil de plásmido parece ser una característica única de cada variedad de *B. thuringiensis*, y el análisis se basa en la determinación del número y peso molecular de cada cepa en estudio.

B. thuringiensis contiene varios plásmidos (1 a 17 dependiendo de la cepa) cuyos tamaños varían entre 2 a más de 200 kilobases (kb) (1.5 a 150 mDa) (Baum y González, 1992). Los plásmidos de *B. thuringiensis* se pueden clasificar en dos grupos: plásmidos de bajo peso molecular (\leq 10 MDa) y plásmidos de elevado peso molecular o megaplásmidos ($>$ 30 MDa), que comparten secuencias de DNA similares (Lereclus *et al.*, 1982). Los dos grupos aparentemente no están relacionados. Los genes *cry* se encuentran en plásmidos de gran tamaño ($>$ 40 kb) (Bravo y Cerón, 2004). Pueden existir una o más copias de un mismo gen de δ -endotoxina en cada plásmido (Sanchis *et al.*, 1988). Los plásmidos de *B. thuringiensis* son conjugativos no solo intraespecie sino también interespecie. Estos se replican y mantienen a lo largo de generaciones con una gran eficacia lo que sugiere que estos replicones pueden presentar una ventaja evolutiva y que por consiguiente justifican su papel dentro del mecanismo de replicación de la bacteria (Bravo y Cerón, 2004).

La mayoría de los plásmidos son crípticos, debido a que se desconoce la función que tiene en la bacteria. La principal función que se conoce es la codificación de toxinas insecticidas especialmente en los plásmidos de alto peso molecular.

3.8.5. Métodos moleculares basados en el DNA

Los métodos moleculares tienen una alta capacidad de discriminación para clasificar o establecer relaciones filogenéticas entre cepas o subespecies. Estos métodos minimizan los problemas de tipificación y reproductibilidad, y en algunos casos generan bases de datos de organismos caracterizados (Olive *et al.*, 1999). La mayoría de los métodos moleculares utilizan la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que fue ideada originalmente por Kleppe *et al.* (1971). Posteriormente, la técnica fue concebida independientemente por Mullis (Saiki *et al.*, 1988). La PCR consiste en la amplificación exponencial de fragmentos específicos de DNA por una enzima polimerasa mediante la utilización de parejas de oligonucleótidos, que se hibridizan a zonas homologas de DNA molde sirviendo de iniciadores para la reacción de síntesis, y en base a esto determinar su presencia o ausencia lo cual ha servido desde el simple mapeo de genomas hasta el descubrimiento de nuevos genes (Porcar y Juárez-Pérez, 2003).

En el caso de *B. thuringiensis* la identificación de los genes codificantes para δ -endotoxinas por PCR ha demostrado ser una metodología muy útil que permite entrever su posible actividad biológica evitando así tener que desarrollar múltiples bioensayos; la presencia de regiones conservadas y variables en la secuencia de los genes cry ha facilitado el reconocimiento de familias y subfamilias, que poseen generalmente el mismo espectro insecticida (Porcar y Juárez-Pérez, 2003). Esta aplicación de la PCR fue iniciada por Carozzi *et al.* (1991) quien diseño oligonucleótidos para los genes cry1Ab, cry3A y cry4A y así identificar cepas antilepidópteros, anticoleópteros y antidipteros respectivamente.

3.9 Control de *Aedes aegypti*

Una estrategia de control sostenible de larvas de mosquitos es el uso de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*). La subespecie *israelensis* de *B. thuringiensis* (*Bti*) fue descubierta en 1976 a partir de mosquitos de una poza del desierto del Negev en Israel (Goldberg y Margalit, 1977). *Bti* muestra una elevada actividad insecticida sobre larvas de dípteros, en particular de mosquitos

(*Culicidae*) y moscas negras (*Simuliidae*); entre los mosquitos, es activo sobre los 3 géneros más importantes: *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, en orden de susceptibilidad (Charles y Nielsen-LeRoux, 2000). El rango de concentración letal 50 (CL50) sobre larvas de cuarto estadio de muchas especies de mosquitos es 10-13 ng/ml (Federici *et al.*, 2003).

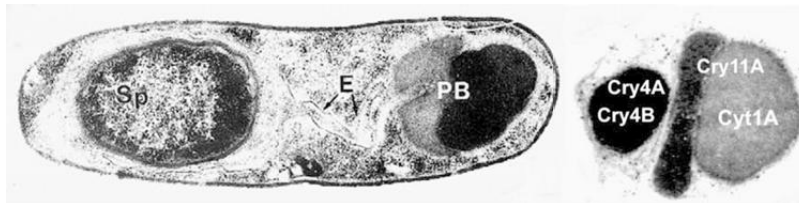


Figura 10. Esporangio de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (izquierda) y cuerpo paraesporal con inclusiones individuales correspondientes a cada toxina de esta subespecie (derecha). Sp, espora; E, exosporio; PB, cuerpo paraesporal. Fuente: (Federici *et al.*, 2003).

Bti produce 4 δ -endotoxinas mayoritarias, Cyt1A (27 kDa), Cry4A (128 kDa), Cry4B (134 kDa) y Cry11A (72 kDa); que se ensamblan en 3 tipos de inclusiones diferentes integradas en un único cuerpo paraesporal mediante una membrana envolvente (Ibarra y Federici, 1986) (Figura 10).

Los productos-*Bt* basados en esta subespecie han logrado un gran éxito y son el principal insecticida microbiológico utilizado en el control de vectores de enfermedades, especialmente en países en desarrollo. Existen diversos formulados comerciales, los más utilizados son VectoBac® y Teknac® (Federici *et al.*, 2003). Aunque el espectro insecticida de *Bti* abarca principalmente especies de dípteros, algunos insectos de otros órdenes, como lepidópteros y coleópteros, también han mostrado cierto grado de susceptibilidad (de Souza *et al.*, 2009).

El éxito experimentado con la cepa *Bti* estimuló en todo el mundo el desarrollo de programas de búsqueda de nuevas bacterias y cepas de *B. thuringiensis* con propiedades mosquitocidas. Hasta la fecha, se han descubierto numerosos aislados activos, aunque su efectividad nunca ha superado la de *Bti* (Federici *et al.*, 2003).

La lista de subespecies en las que se ha hallado algún aislado mosquitocida es muy amplia: *jegathesan* (Btjeg) (Seleena *et al.*, 1995); *medellin* (Btmed) (Orduz

et al., 1992); *morrisoni* (Gill *et al.*, 1987); *higo* (Saitoh *et al.*, 2000); *aizawai* (Ito *et al.*, 2006a); *entomocidus* (Ito *et al.*, 2006b); *sotto* (Ohgushi *et al.*, 2003); *mogi* (Roh *et al.*, 2009); *fukuokaensis* (Yu *et al.*, 1991); *darmstadiensis*, *kyushuensis*, *leesis*, *thompsoni*, *malaysiensis*, *canadensis* (Güerchicoff *et al.*, 2001).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica (Laboratorio de Bioinsecticidas), establecido en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), ubicado en Irapuato, Guanajuato.

Varios de los procedimientos utilizados en este trabajo se describen con detalle en el Anexos, por lo que en esta sección sólo se referirá al tipo de procedimiento.

4.1 Muestreo

En el municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca lugar en donde esta ubicado el CIIDIR IPN Unidad Oaxaca, se colectaron muestras de telaraña en la Bioplanta de producción masiva de nematodos, en el invernadero de cría de insectos y en casa-habitación. Las muestras de suelo se tomaron en parcelas sembradas con maíz, frijol y calabaza. Se tomaron aproximadamente 20-50g de muestra de suelo en los primeros 10cm de profundidad para evitar la inactivación de las esporas por la radiación UV, limpiando previamente la superficie con una pala cuadrada; así mismo se colectó estiércol de equino, ovino y sedimento de agua estancada en acequias. Las muestras de telaraña fueron recogidas en tubos Eppendorf de plástico estériles de 1.5 ml y fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Las muestras de suelo fueron colectadas en bolsas de plástico estériles.

4.2 Aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis*

El aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* a partir de las muestras fue llevado conforme a la metodología de Bel *et al.*, (1997) que se describe a continuación:

El suelo, el estiércol y el sedimento se sometieron primeramente a un secado para posteriormente facilitar su homogeneización en un mortero y de esta manera fueron tamizados en malla de 40mm se pesó 1g de las muestras pulverizadas y se colocó 1 gramo en un tubo de ensaye, al cual se le añadieron 10 ml. de agua destilada estéril, en seguida se sometieron a una agitación en vórtex con el fin de homogeneizar el contenido.

Las telarañas se colocaron directamente en tubos Eppendorf con 1ml de agua destilada estéril adicionada con sol. Tween al 80. La razón de utilizar solución Tween en el agua se basa en el principio del efecto "detergente" de dicha solución para romper la tensión superficial y liberar todas las partículas contenidas en materiales difíciles de procesar tales como los anteriores.

Los tubos Eppendorf se sometieron a pasteurización colocándolos en baño maría a 65°C durante 30 minutos. Inmediatamente después se les dió un "shock" térmico, colocando los tubos en hielo durante 15 minutos. Por segunda ocasión se agitaron, aproximadamente por 1 minuto, para de esta manera tomar las alícuotas correspondientes.

Con una pipeta de 20µl se tomaron 10µl de cada tubo de ensaye y se colocaron en Eppendorfs llevándolos a un volúmen de 200µl con agua destilada estéril agitando el contenido.

En medio de cultivo sólido (Agar para métodos estándar) se colocaron 150µl del contenido de los tubos Eppendorf, se plaqueó en las caja petri correspondientes distribuyendo uniformemente el contenido por toda la superficie y se incubaron a una temperatura de 28°C por 24 horas.

Transcurridas 24 horas de incubación, se procedió a aislar las colonias bacterianas correspondientes a cada muestra, dando prioridad a aquellas que presentan las características típicas de las colonias de *B. thuringiensis* tales como un color blanquecino, aspecto farinoso, bordes irregulares y difusos.

Con la ayuda de una asa bacteriológica se tomó cada una de estas colonias e inmediatamente se hicieron pasar a gotas de medio de cultivo sólido (Agar para métodos estándar) contenidas en cajas petri para de esta manera obtener un "microcultivo" de cada colonia. Tanto el plaqueo como el aislamiento se realizaron

en condiciones estériles en la campana de flujo laminar. Dichas gotas se incubaron a una temperatura de 28 °C durante 48 horas.

4.3 Caracterización de los cristales paraesporales

Los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* fueron examinados por microscopía de contraste de fases. Para las observaciones se utilizaron muestras autolizadas de cada una de las cepas seleccionadas. Se tomó media asada del cultivo y se esparcieron en un cubreobjeto, se dejaron secar al aire y se les agregó una gota de glicerol al 50% para posteriormente taparlos con un cubreobjeto. Las muestras se observaron en un microscopio óptico de contraste de fases a 100x (3781, Axioplan Zeiss, Alemania).

4.4 Extracción de plásmidos

A continuación se describe el método de extracción de DNA plásmidico utilizado para la obtención del perfil de plásmido de las cepas tipo y serovares de *B. thuringiensis*.

Se realizó un preinóculo con 3 ml de medio LB por 14 horas a 28°C con agitación constante (220 rpm). Se transfirió una parte del cultivo a un tubo Eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 5 000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se agregó el resto del cultivo, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó dos veces con 1 ml de agua desionizada y una vez con 500 µL de buffer Tris 50 mM, pH 8.0, centrifugando a 5000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se resuspendió la pastilla celular remante por medio de agitación fuerte. Luego se agregaron 400 µL buffer Tris 25 mM, EDTA 10 mM, Sacarosa 10 %, adicionando lisozima (20 mg/ml de buffer = 8 mg de lisozima/400 µL de buffer). Se incubó a 37 °C con agitación lenta (75 rpm) durante 2.5 horas. Se adicionaron 100 µL de buffer Tris 25 mM, SDS (Dodecilsulfato de sodio) al 12.5 %, Na OH 0.2 N, pH 13.0, adicionando RNAsa

(20 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de buffer = 2 μL de RNAsa para c/ tubo). Mezclandose invirtiendo el tubo 10 veces, se incubó a 68 °C por 10 minutos. (Empleando para ello el termoblock o bien en baño maría). Se agregaron 250 μL de NaCl 5 M, se mezcló invirtiendo el tubo 5 veces y se dejó reposar a -20 °C durante 5 minutos. Se centrifugó a 1300 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 250 μL de Acetato de sodio 3 M, pH 5.0. Mezclando invirtiendo 5 veces el tubo. Se volvió a reposar a -20°C durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 1300 rpm durante 20 minutos. Se recupera el sobrenadante en otro tubo Eppendorf de 2 ml, limpio y estéril. (El proceso se repitió dos veces). Al sobrenadante se agregó 1 ml de Isopropanol absoluto frío (-20°C). Para acelerar la precipitación del DNA se mezcló invirtiendo el tubo 5 veces y se dejó reposar a -20°C durante 20 minutos. Para recuperar la pastilla de DNA se centrifugó a 1300 rpm durante 20 minutos, desechando el sobrenadante. La pastilla se lavó con 200 μL de Etanol al 70 % frío y se reposó por 15 minutos a -20°C. Se centrifugó a 1300 rpm durante 16 minutos, el sobrenadante se desechó y se secó la pastilla a 37°C durante 15 minutos, dejando acostado el tubo boca abajo. La pastilla se resuspendió 100 μL agua desionizada (para restricción y ligación) agitando con la mano. El resultado se observó en un gel de agarosa al 0.6%, y la electroforesis se realizó a 65 V por 90 minutos (Sambrook *et al.*, 2001).

4.5 Electroforesis de DNA plasmídico

Para visualizar los patrones de plásmidos se utilizaron 10 μL de suspensión de DNA, los cuales fueron visualizados en geles de agarosa horizontal (11 cm x 14 cm) al 0.6 % con 14 pozos, utilizando Tris-borato- EDTA (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA) 1X. Los geles fueron sometidos a 2 V/cm, durante 20 h. Posteriormente fueron teñidos de 10-15 min en bromuro de etidio a una concentración de 0.4 $\mu\text{L}/\text{ml}$ y desteñidos en agua desionizada durante 1 h. Los geles obtenidos fueron fotografiados en el sistema Gel Doc 2000 TM Gel Documentacion system (BioRad Corporation) bajo luz ultravioleta y almacenados como imágenes TIFF. En cada

gel se utilizó el marcador de peso molecular de “Supercoiled” (Invitrogen) y la cepa *kurstaki* HD1 como cepa de referencia.

4.6 Extracción del DNA total

La extracción del DNA cromosómico se realizó utilizando el método reportado por Rosso (1997) modificado (Anexo I).

Se visualizó la integridad del DNA en geles de agarosa al 1%. Las muestras de DNA extraídas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

El DNA obtenido se utilizó para la amplificación del gen de la flagelina por PCR.

4.7 Amplificación del gen de la flagelina por PCR

Las PCR se realizaron con dos juegos de oligos: BTFlaA3 y BTFlaA4, BTFlaA5 y BTFlaA6.

Los oligos BTFlaA3 y BTFlaA4 se obtuvieron a partir de los extremos de la secuencia de flagelina *flaA* de *B. thuringiensis*, del serovar *alesti*. Todas las cepas se sometieron a PCR con este juego de oligos.

Oligo directo (BTFlaA3): 5' ACAAATATTAATAGCATGCG 3'

Oligo de reversa (BTFlaA4): 5'TTGTAATAATTTAGAAGCC 3'

Estos oligos se ubican en los nucleótidos 13 y 228 río abajo de los codones de inicio y terminación del gen de la flagelina, respectivamente.

Los oligos BTFlaA5 y BTFlaA6, se obtuvieron de la zona conservada, obtenida a partir del primer alineamiento hecho en las primeras secuencias hechas con los oligos anteriores, lo más externo posible; estos oligos fueron utilizados con las cepas que no amplificaron con BTFlaA3 y BTFlaA4.

Iniciador directo (BTFlaA5): 5' ATGAGCAATTCTATGGACCG 3'

Iniciador de reversa (BTFlaA6): 5' TTTCAGACATTTCTTTTCGCC 3'

Condiciones 1. Las condiciones generales utilizadas en las PCR son las siguientes:

Suatancia	Cantidad o Concentración
DNA	100 ng (1 μ L)
Oligos	600 ng de cada uno
Solución de Mg ⁺⁺	3 mM
DNTP	200 μ M

Todo se lleva a un volumen final de 50 μ L

Pasos	Evento	Temperatura (°c)	Tiempo
1	Desnaturalización	95	10 min
2	Desnaturalización	96	15 s
3	Alineamiento	47	15 s
4	Extensión	72	1 min
5	Repetición de ciclo 34 veces desde el paso 2		
6	Extensión final	72	10 min
7	Conservación	10	∞

Cuando la reacción fue inespecífica se cambiaron las condiciones de concentración de Mg⁺⁺, tiempo de alineamiento y / o de oligos:

Condiciones 2. El tiempo de alineamiento se cambió de 15 s a 30 s; esto se aplico únicamente a algunas cepas que no amplificaron con las "Condiciones1".

Se corrieron geles de agarosa al 1%, se cortaron las bandas de interés y se reamplificaron, tomando 1 μ L de DNA por cepa, para mandar secuenciar cada fragmento. El marcador molecular utilizado fue el "Smart" de Eurogentec Bel sa.

4.8 Bioensayos con *Aedes aegypti*

Se realizó un bioensayo burdo con larvas del cuarto instar de *A. aegypti* provenientes del insectario del CINVESTAV Irapuato. Para ello se prepararon vasos plásticos con 100 ml de agua desclorinada y 20 larvas (Mclaughlin *et al.*, 1983). Posteriormente se añadió una asada del complejo espora cristal de las cepas aisladas. Se utilizó un total de 80 larvas para el bioensayo con el complejo espora cristal de *Bti* para el control positivo. La mortalidad se determinó a las 24 h bajo condiciones de 70% de humedad relativa y 28°±2°C.

El bioensayo fino para determinar la CL50 se realizó a partir de una solución madre de 10 mg del complejo espora cristal por ml. Para esto fue necesario contar con un peso seco constante de cada una de las diferentes muestras que presentaron toxicidad. Estos se obtuvieron siguiendo el protocolo (Anexo II). El bioensayo se preparó utilizando vasos plásticos con 100 ml de agua desclorinada y 20 larvas (Mclaughlin *et al.*, 1983).

Los diferentes tratamientos usados fueron como se describe a continuación:

Cepa estándar *Bti* (control)

Susp. Madre 10.0 mg complejo espora-cristal + 1 ml de solución Tween (10 mg/ml)

Susp. I 100 µl susp. Madre + 900 µl Tween (1 mg/ml)

Susp. II 100 µl susp. I + 900 µl Tween (100 µg/ml)

Susp. III 150 µl susp. II + 850 µl Tween (15 µg/ml)

Conc. (ng/ml)

30

21

14.7

10.29

7.203

5.0421

S4 (17)

Susp. Madre 10.0 mg complejo espora-cristal + 1 ml de solución Tween (10 mg/ml)

Susp. I 100 µl susp. Madre + 900 µl Tween (1 mg/ml)

Susp. II 250 µl susp. I + 19.75 µl Tween (12.5 µg/ml)

Conc. (ng/ml)

125

87.5

61.25

42.87

30.01

21.00

14.70

10.29

7.20

5.04

S18 (60)

Susp. Madre 10.0 mg complejo espora-cristal + 1 ml de solución Tween (10 mg/ml)

Susp. I 100 µl susp. Madre + 900 µl Tween (1 mg/ml)

Susp. II 100 µl susp. I + 900 µl Tween (100 µg/ml)

Susp. III 150 µl susp. II + 850 µl Tween (15 µg/ml)

Conc. (ng/ml)

30

21

14.7

10.29

7.203

5.0421

S19 (65)

Susp. Madre 10.0 mg complejo espóra-cristal + 1 ml de solución Tween (10 mg/ml)

Susp. I 100 µl susp. Madre + 900 µl Tween (1 mg/ml)

Susp. II 100 µl susp. I + 900 µl Tween (100 µg/ml)

Susp. III 150 µl susp. II + 850 µl Tween (15 µg/ml)

Conc. (ng/ml)

30

21

14.7

10.29

7.203

5.0421

La mortalidad se determinó a las 24 horas y se realizó un análisis PROBIT de los resultados.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Muestreo y aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis*

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las muestras colectadas en suelos de Oaxaca, así como las telarañas son una importante fuente de *B. thuringiensis*. En las muestras analizadas se encontró 80% de presencia de *B. thuringiensis* que es un alto porcentaje. Dicho valor es similar a lo señalado previamente por otros autores en muestreos realizados en distintas regiones de los cinco continentes (Chilcott y Wigley, 1993). Así mismo, también en otros estudios se han encontrado porcentajes de muestras con presencia de *B. thuringiensis* que oscilan entre un 20 y un 30% (Iriarte *et al.*, 1998) o hasta el 92% (Belt *et al.*, 1997). La mayor o menor riqueza de muestras con *B. thuringiensis* puede depender del número de colonias analizadas en cada muestra. Así por ejemplo, en nuestro estudio sólo se analizaron 10 colonias por muestra mientras que en el trabajo publicado por Belt *et al.*, (1997) se analizaron entre 30 y 50 colonias.

Cuadro 3. Incidencia de *Bacillus thuringiensis* en las muestras colectadas

Origen de la muestra	Muestras analizadas	% muestras con Bt	Colonias observadas	% colonias con Bt
Telaraña	33	90	100	50
Suelo	38	70	208	40
TOTAL	71	80	308	90

Independientemente de la mayor o menor riqueza encontrada, actualmente se admite que *B. thuringiensis* es una bacteria distribuida en todo el mundo y se haya presente en prácticamente todos los hábitats muestreados. Nuestros resultados claramente revelan la presencia de *B. thuringiensis* en todo el territorio muestreado y, por tanto, permiten confirmar que el enclave geográfico de Oaxaca no es una excepción en este sentido.

5.2 Caracterización de los cristales paraesporales

De la selección de colonias observadas y caracterizadas molecularmente se obtuvieron un total de 29 cepas de *B. thuringiensis*, las cuales fueron observadas al microscopio de contraste de fases. Es importante aclarar que esta caracterización fue básicamente morfológica, considerando exclusivamente la estructura del cristal de las cepas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Caracterización morfológica de los cristales en las cepas aisladas de *B. thuringiensis*

No.	CEPA	ORIGEN	TIPO DE CRISTAL
1	BIOT 1(2)	Telaraña	Bipiramidal
2	BIOT 2	Telaraña	Bipiramidal casi cuadrada
3	BIOT 3	Telaraña	Bipiramidal
4	BIOT 4	Telaraña	Bipiramidal
5	INVT 1	Telaraña	Bipiramidal
6	CAST 1	Telaraña	Bipiramidal y esférico
7	S 1	Cultivo Maíz No. 1	Bipiramidal
8	S 2	Cultivo Maíz No. 2	Bipiramidal
9	EO 1	Estiércol de Ovino	Cúbico
10	S 3	Cultivo Maíz No. 1	Bipiramidal
11	S 4(17)	Cultivo Maíz No. 1	Esférico
12	SED 1	Canal presa del Chapulín	Bipiramidal
13	SED 2	Margen del Río Atoyac	Bipiramidal
14	SED 3	Margen del Río Atoyac	Bipiramidal
15	SED 4	Margen del Río Atoyac	Bipiramidal
16	S 6	Cultivo Maíz y frijol No. 1	Bipiramidal
17	S 7	Cultivo Maíz y frijol No. 2	Bipiramidal
18	S 8	Cultivo Maíz y frijol No. 3	Bipiramidal
29	S 9	Cultivo Maíz y frijol No. 4	Bipiramidal
20	S 10	Barbecho 1	Bipiramidal
21	S 11	Barbecho 1	Bipiramidal
22	S 12	Barbecho 2	Bipiramidal
23	S 13	Barbecho 2	Bipiramidal
24	S 14	Barbecho 3	Bipiramidal
25	S 15	Cultivo de alfalfa	Cúbico
26	S 16	Barbecho 1	Bipiramidal
27	S 17	Milpa (Maíz, frijol y calabaza)	Bipiramidal
28	S 18 (60)	Milpa (Maíz, frijol y calabaza)	Esférico
29	S 19 (65)	Milpa (Maíz, frijol y calabaza)	Esférico

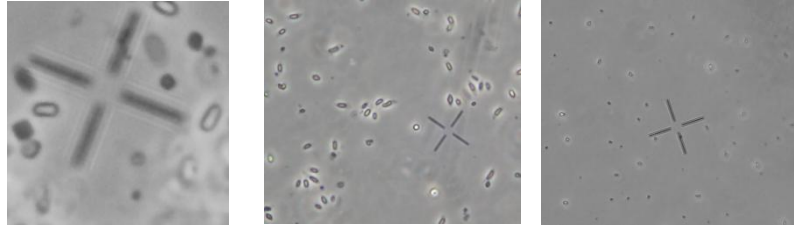


Figura 11. Morfología de cristales a) Cúbico b) Bipiramidal, c) Esférico

La morfología del cristal en algunos casos refleja el tipo de especificidad insecticida, aunque la clasificación en base al tipo de cristal es compleja y poco aplicable, es una característica importante dentro de la caracterización de un aislado (Aronson *et al.*, 1986).

Aunque generalmente predomina la forma bipyramidal, en las cepas aisladas, característica de la mayoría de las cepas pertenecientes a *B. thuringiensis*, fue posible distinguir morfologías cúbicas y esféricas. Similares resultados fueron hallados por del Del Rincón-Castro *et al.* (2006), quienes al analizar tres cepas nativas del estado de Guanajuato, México, también encontraron cristales bipyramidales típicos de las cepas de *B. thuringiensis*.

Lee (1995) analizó 113 aislados de *B. thuringiensis* y encontró gran variedad en la morfología de los cristales. Observó cuerpos parasporales bipyramidales, amorfos, esféricos, cúbicos y rectangulares. Igualmente Carreras (2003) advirtió cristales bipyramidales de diferentes tamaños, así como cúbicos y amorfos en un grupo de cepas nativas de *B. thuringiensis* estudiadas. Se plantea que el cristal bipyramidal generalmente se asocia con la toxicidad de la cepa contra insectos lepidópteros y la presencia en ellas de la proteína Cry 1. (Glare y Callaghan, 2000). Los cristales cúbicos y ovoides son activos tanto para lepidópteros como dípteros, y se relaciona a la inclusión cúbica con la proteína Cry 2 (Glare y Callaghan, 2000).

Los resultados del presente trabajo coincidieron con los de Ruiz de Escudero *et al.* (2004) y Rosas *et al.* (2008), en que hubo un predominio de la morfología bipyramidal.

5.3 Análisis de los patrones de plásmidos

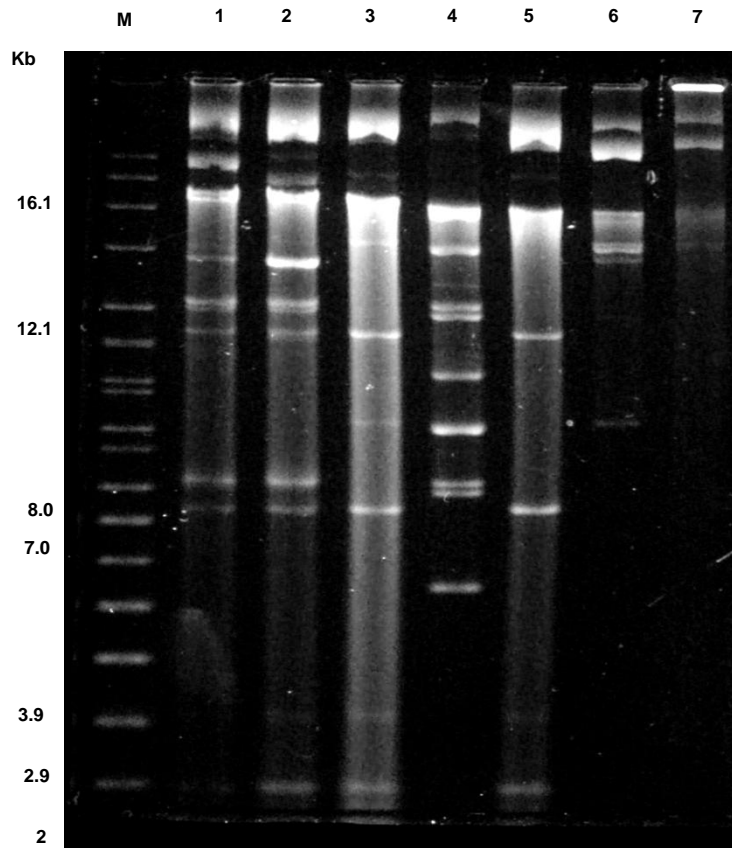


Figura 12. Patrón de plásmidos de cepas nativas tipo *B. thuringiensis* procedentes de telaraña 1. *kurstaki* HD1, 2. BIOT1, 3. BIOT2, 4. BIOT3, 5. BIOT4, 6. INVT1, 7. CAST1, M. Marcador de peso molecular supercoiled DNA (Invitrogen).

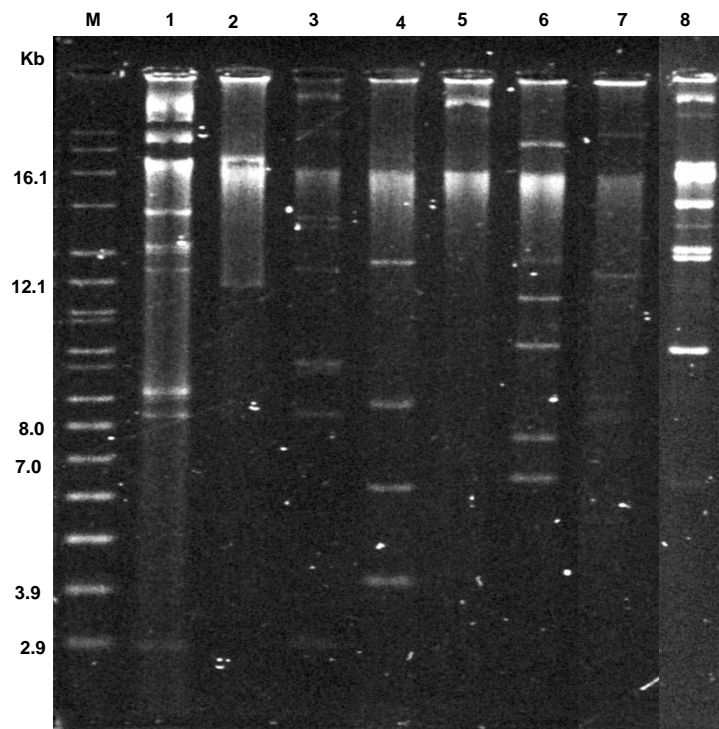


Figura 13. Patrón de plásmidos de cepas nativas tipo de *Bacillus thuringiensis* procedentes de suelo 1. *kurstaki* HD1, 2. S1, 3. S2, 4. EO1, 5. S3, 6. S4, 7. SED1, 8. SED2. M. Marcador de peso molecular supercoiled DNA (Invitrogen).

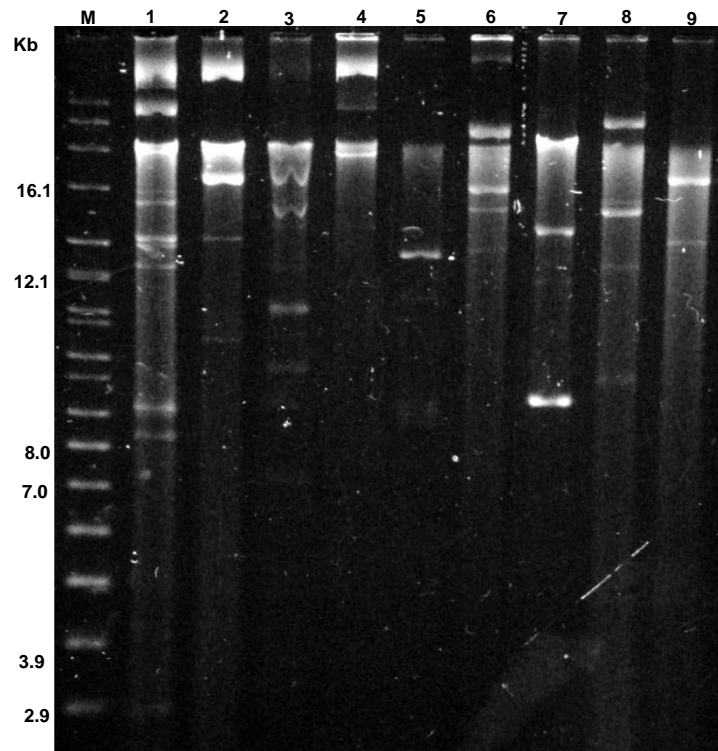


Figura 14. Patrón de plásmidos de cepas nativas tipo de *Bacillus thuringiensis* procedentes de suelo (continuación) 1. *kurstaki* HD1, 2. SED3, 3. SED4, 4. S6, 5. S7, 6. S8, 7. S9, 8. S10, 9. S11, 10. S12, 11. S13 M. Marcador de peso molecular supercoiled DNA (Invitrogen).

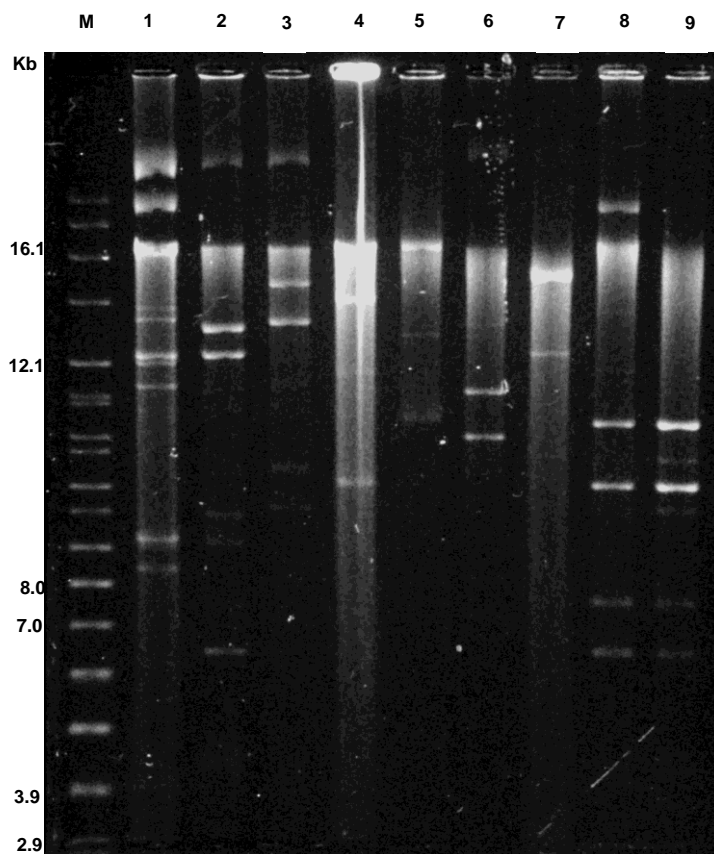


Figura 15. Patrón de plásmidos de cepas nativas tipo de *Bacillus thuringiensis* procedentes de suelo (continuación) 1. *kurstaki* HD1, 2. S14, 3. S15, 4. S16, 5. S17, 6. S18, 7. S19. M. Marcador de peso molecular supercoiled DNA (Invitrogen).

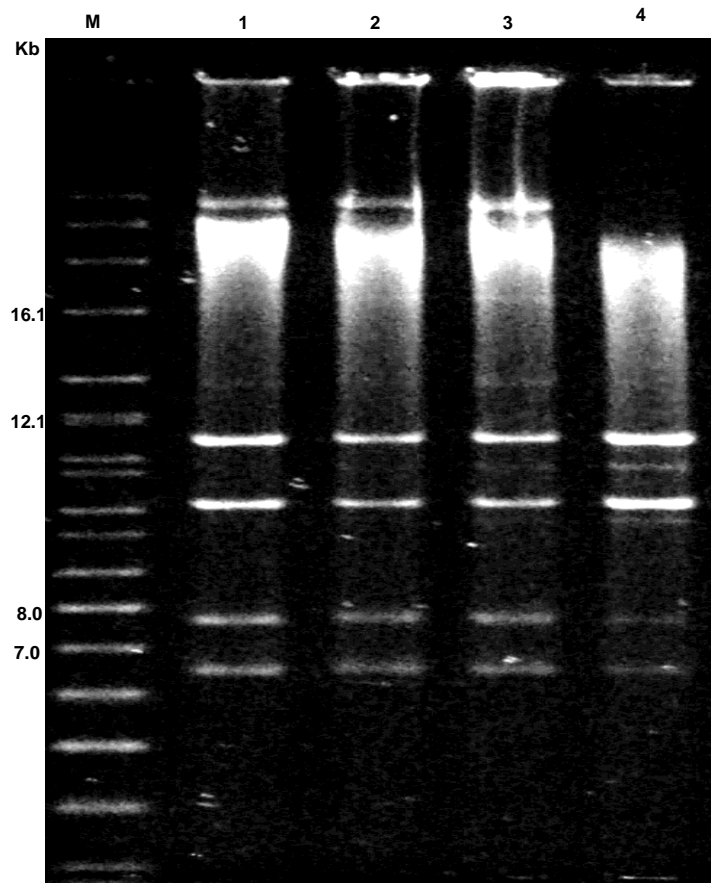


Figura 16. Patrón de plásmidos de cepas con potencial mosquitocida 1. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 2. S4(17), 3. S18(60), 4. S19(65). M. Marcador de peso molecular supercoiled DNA (Invitrogen).

Se realizó la extracción de plásmidos de las 29 cepas de *B. thuringiensis*. Los perfiles de los plásmidos mostraron una gran variabilidad desde un solo plásmido hasta 7; así mismo se observó que hay bandas de plásmidos comunes en 3 cepas que forman grupos definidos que puedan ser agrupados.

El interés en los plásmidos de *B. thuringiensis* comenzó a finales de los 70, cuando se estableció la correlación entre la formación de cristales y la presencia de ciertos plásmidos (González *et al.*, 1982). La característica distintiva de *B. thuringiensis* es la presencia de las inclusiones cristalinas o cuerpos parasporales de naturaleza proteica. La formación de estas estructuras es un proceso asociado al evento de esporulación, en el cual los cristales se liberan al medio por lisis del esporangio. Su formación responde además a la presencia de genes que codifican

para su producción, localizados en plásmidos de alto peso molecular (Glare y Callaghan, 2000; Gitahy *et al.*, 2007).

Los genes cry se encuentran en plásmidos de gran tamaño (>40 kb) (Bravo y Cerón, 2004).

Todo parece indicar que las cepas S4(17), S18(60), S19(65) pertenecen a la cepa *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* dado el patrón similar de plásmidos, esto es posible debido a que una cepa de *B. thuringiensis* puede contener varios genes Cry, o bien el mismo gen puede encontrarse en diferentes subespecies sin importar su distribución geográfica; por ejemplo, López-Meza *et al.*, (1995) reportaron que cepas de *B. thuringiensis* subespecies *kenyae* y *entomocidus* aisladas en Irapuato, Gto. contienen los mismos genes similares que *B. thuringiensis* serovar *israelensis* aislada del desierto del Negev Israel (Golbert y Margalit, 1997).

5.4 Amplificación del gen de la flagelina por PCR

Al utilizar las condiciones de amplificación por PCR, deducidas a partir de las características de los iniciadores y de las condiciones estandarizadas de las reacciones de PCR, se pudo obtener la amplificación de un fragmento discreto y bien definido del gen de la flagelina, en las cepas bajo estudio. Estas cepas fueron: S4(17), S18(60), S19(65). El gel (Figura 17) muestra una amplificación adecuada en los carriles 1, 2, 3 y 4, correspondientes a las cepas Bti, S4(17), S18(60) y S19(65), utilizando los iniciadores BTFIaA3: 5'-ACAAATATTAATAGCATGCG-3' y BTFIaA4: 5'-TTGTAATAATTTAGAAGCC-3'.

En todos los casos, como se observa, el producto de amplificación es mayor a los 500 pb y menor a 1000 pb.

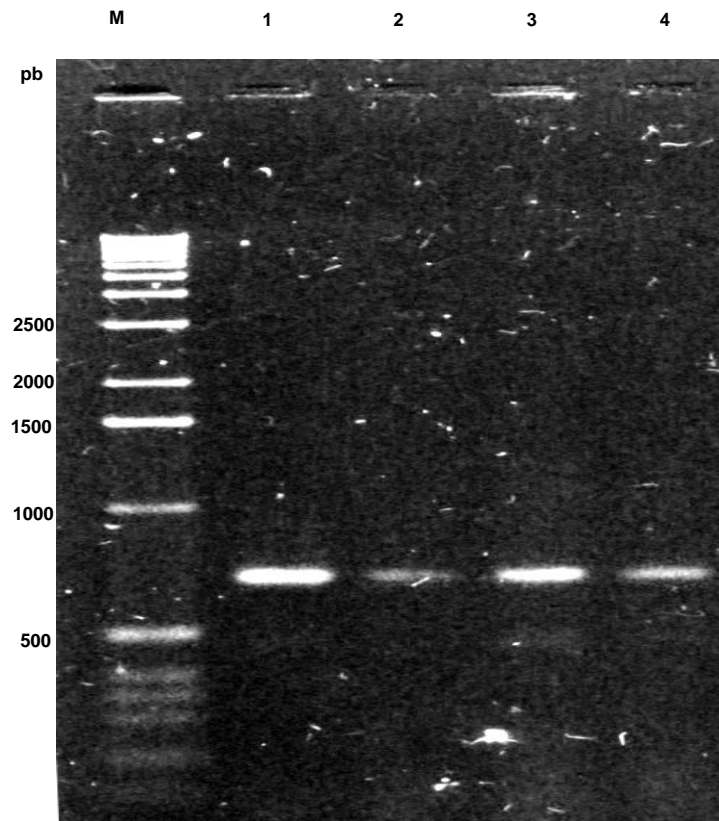


Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa al 1%, donde se muestran los productos de la amplificación por PCR de 1. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 2. S4(17), 3. S18(60), 4. S19(65). La masa molecular del marcador está dada en pares de bases (bp).

5.5 Bioensayos de efectividad biológica con *Aedes aegypti*



Figura 18. Bioensayos de *A. aegypti*, arriba) larva necrosada después de 24 horas que se alimentó con el complejo espora cristal y abajo) larva control.

5.5.1 Bioensayo burdo

El bioensayo burdo con larvas de *A. aegypti* demostró que el complejo espora cristal de las 29 cepas evaluadas, solamente las cepas S4(17), S18(60), S19(65) presentaron toxicidad en las larvas del mosquito, esto representa el 10.34% del total de las cepas probadas (Cuadro 5).

La mortalidad causada por las tres cepas que mostraron efecto tóxico en las larvas del cuarto instar de *A. aegypti* fue de 100% a las 24 horas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Bioensayo burdo del complejo espora-cristal de las cepas S4(17), S18(60), S19(65) y Bti con larvas del cuarto instar de *A. aegypti* (mosquitos).

Tratamientos	Tratados	Muertos	Mortalidad %
S4(17) R ₁	20	20	100
S18(60)R ₁	20	20	100
S19(65)R ₁	20	20	100
<i>Bti</i> R ₁	20	20	100
Testigo	20	0	0

5.5.2 Bioensayo fino para la determinación de la DL50

En el cuadro 6 se presenta el efecto tóxico causado por la cepa control *Bti*, en el cual se observa que con una dosis de 30 y 21 ng/ml se registraron los más altos niveles de mortalidad que fueron de 100 y 80% respectivamente, el cálculo de la DL50 con un valor de 9.426 ng/ml, así como la DL95 con un valor de 27.806 ng/ml.

Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad, CL50 y CL95 del complejo espora-cristal de la cepa control *Bti* en larvas del cuarto instar de *A. aegypti*.

Tratamiento	Dosis (ng/ml)	Tratados	Muertos	Mortalidad %	CL50 (ng/ml)	Límites Fiduciales	CL95 (ng/ml)	Límites Fiduciales
1	30	60	60	100				
2	21	60	48	80				
3	14.7	59	44	74.58				
4	10.29	58	36	62.07	9.426	8.432-10.431	27.806	23.28-35.651
5	7.20	56	21	37.5				
6	5.04	60	8	13.33				
Control	0	60	0	0				

En el cuadro 7 se presenta el efecto tóxico causado por la cepa S4(17), en el cual se observa que con una dosis de 61.25 ng/ml se registró la mortalidad más alta que fue de 92.5%, una DL50 con un valor de 26.91 ng/ml y una DL95 de 131.641 ng/ml.

Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad, CL50 y CL50 del complejo espora-cristal de la cepa S4(17) en larvas del cuarto instar de *A. aegypti*

Tratamiento	Dosis (ng/ml)	Tratados	Muertos	Mortalidad %	CL50 (ng/ml)	Límites Fiduciales	CL95 (ng/ml)	Límites Fiduciales
1	61.25	80	74	92.5				
2	42.875	80	56	70				
3	30.0125	79	37	46.84				
4	21.0087	80	24	30	26.91	20.121-39.287	131.641	73.772-485.273
5	14.7061	80	15	18.75				
6	10.2942	78	10	12.82				
7	7.2060	80	11	13.75				
8	5.0442	60	7	11.67				
Control	0	80	0	0				

En el cuadro 8 se presenta el efecto tóxico causado por la cepa S18(60), en el cual se observa que con una dosis de 30ng/ml se registró la mortalidad más alta que fue de 95.92%, una DL50 con un valor de 13.196 ng/ml y una DL95 de 35.466 641 ng/ml.

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad, CL50 y CL50 del complejo espora-cristal de la cepa S18(60) en larvas del cuarto instar de *A. aegypti*.

Tratamiento	Dosis (ng/ml)	Tratados	Muertos	Mortalidad %	CL50 (ng/ml)	Límites Fiduciales	CL95 (ng/ml)	Límites Fiduciales
1	30	98	94	95.92				
2	21	99	69	69.7				
3	14.7	100	59	59				
4	10.29	98	35	35.71	13.196	12.276-14.199	35.466	30.815-42.467
5	7.20	96	14	14.58				
6	5.04	97	6	6.19				
Control	0	100	0	0				

En el cuadro 9 se presenta el efecto tóxico causado por la cepa S19(65), en el cual se observa que con una dosis de 30ng/ml se registró la mortalidad más alta que fue de 97.5%, una DL50 con un valor de 10.823 ng/ml y una DL95 de 29.324 ng/ml.

Cuadro 9. Porcentaje de mortalidad, CL50 y CL50 del complejo espora-cristal de la cepa S19(65) en larvas del cuarto instar de *A. aegypti*.

Tratamiento	Dosis (ng/ml)	Tratados	Muertos	Mortalidad %	CL50 (ng/ml)	Límites Fiduciales	CL95 (ng/ml)	Límites Fiduciales
1	30	80	78	97.5				
2	21	80	70	87.5				
3	14.7	80	52	65				
4	10.29	79	35	44.3	10.823	9.951-11.737	29.324	25.314-35.582
5	7.20	78	18	23.08				
6	5.04	77	11	14.29				
Control	0	80	0	0				

5.6 Análisis comparativo de la toxicidad de las tres cepas con potencial mosquitocida con respecto a *Bti*

En el cuadro 10 se presentan los datos concentrados de los resultados obtenidos en los bioensayos finos de las tres cepas con potencial mosquitocida y la *Bti* (control), en el cual se observa que las mejores DL50 de las cepas S18(60) y S19(65) con un valor de 13.2 y 10.82ng/ml respectivamente, que son similares a la DL50 de la cepa *Bti* (control) con un valor de 9.43ng/ml. En las mismas cepas las DL95 tuvieron el mismo comportamiento, por lo tanto estos resultados nos indican que las cepas S18(60) y S19(65) tienen alto potencial mosquitocida, siendo similar a la cepa *Bti* (control) usada como estándar y con mejor potencial a la cepa *Bti* analizada por Wirth *et al.*, (2004), quienes reportan una DL50 de 22.3 ng/ml para el complejo espora cristal.

Cuadro 10. Toxicidad del complejo espora-cristal de las cepas S4(17), S18(60), S19(65) y Bti con larvas del cuarto instar de *Aedes aegypti* a las 24 horas.

Tratamientos	DL50 (ng/ml)	DL95 (ng/ml)	SD	C.V.
S4(17)	26.91	131.641	4.73	17.57%
S18(60)	13.2	35.47	2.97	21.90%
S19(65)	10.82	29.324	1.61	14.78%
<i>Bti</i>	9.43	27.806	0.56	6.02%

VI. CONCLUSIONES

- 1.- En el 80% de las muestras se encontró presencia de *B. thuringiensis*, lo que indica que es un microorganismo abundante en la naturaleza.
- 2.- El mayor número de cepas de *B. thuringiensis* se encontraron en muestras de suelo.
- 3.- En las cepas de *B. thuringiensis* el cristal I (bipiramidal) presentó la mayor incidencia.
- 4.- Se obtuvieron dos cepas altamente tóxicas a *Aedes aegypti*, cuyas CL50 fueron 10.82 y 13.2ng/ml respectivamente similares a la *Bti* (control, CL50 de 9.43ng/ml) usada como estándar.
- 5.- La ultraestructura de los cristales de las cepas con potencial mosquitocida muestra gran semejanza con el patotipo II, con cristales típicamente esféricos.
- 6.- Es importante continuar con el aislamiento y caracterización molecular y biológica de cepas nativas de *B. thuringiensis* para disponer de mayores alternativas de control biológico de insectos.

VII. LITERATURA CITADA

- Agaisse, H. and D. Lereclus. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal cristal protein?. J. Bacteriol (21): 6027-6032.
- Angus, T.A. 1954. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. Nature (London). 173: 54-56.
- Angus, T.A. 1956. Some properties of a bacterial toxin affecting insect larvae. Canad. Dept. of Agriculture Division forest biology. 10: 4.
- Angus, T.A., 1956. Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. Can. J. Microbiol., 2: 122-131.
- Aoki, K. and Chigasaki, Y., 1915. Ueber die Pathogenitat dersog. Sotto-Bacillcn (Ishiwata) bci Seidenraupen. Mitt.Med. Fak. Tokio, 13: 419-440.
- Armengol, G., Escobar, M. C., Maldonado, M. E. y Orduz, S. (2006). Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. J Appl Microbiol In Press.
- Baig, D.N., Mehnaz, S., 2009. Determination and distribution of cry-type genes in halophilc *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. Microbiol.Res.. DOI 10.1016/j.micres.2009.08.003.
- Ball, D.A., Taylor, R., Todd, S.J., Redmond, C., Couture-Tosi, E., Sylvestre, P., Moir, A., Bullough, P.A., 2008. Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. Mol. Microbiol. 68, 947-958.
- Baum, J.A., Malvar, T., 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol. 18, 1-12.
- Baum, J. A., T. J. Jonhson and B. C. Carlton. 1999. *Bacillus thuringiensis* natural and recombinant bionsecticide products. In: Methods in Biotechnology, vol. 5: Biopesticides: Use and deliver. F. R. Hall and J. J. Menn, (Eds), Human Press Inc. NJ. Pp. 189-209.
- Barloy, F., Lecadet, M.M., Delecluse, A., 1998. Distribution of clostridial cry-like genes among *Bacillus thuringiensis* and *Clostridium* strains. Curr. Microbiol. 36, 232- 237.

- Berliner, E., 1915. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuehniella* Zell.). Z. Angew. Entomol. 2, 29-56.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A., Holden, M.T., Harris, D., Zaritsky, A., Parkhill, J., 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5082-5095.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J., 2005. Crystal structure of the mosquitolarvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. J. Mol. Biol. 348, 363-382.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., Lescar, J., 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. J. Bacteriol. 188, 3391-3401.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49, 423-435.
- Buitrago, G. 2004. La producción de ingredientes activos con *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 233-273.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: date and hypotheses. Appl. Environ. Microbiol. 69:2415-2422.
- Campbell, P.M., Cao, A.T., Hines, E.R., East, P.D., Gordon, K.H., 2008. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. Insect Biochem. Mol. Biol. 38, 950-958.
- Cerón, A. J. (2001). Productos comerciales nativos y recombinantes de *B. thuringiensis*, en: Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. (Caballero, P. y Ferré, J.). Phytoma – España pp. 153 – 168.
- Cerón, J. 2004. Productos comerciales: nativos y recombinantes. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 123-147.

- Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A., 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Mol. Biol.* 380, 820-827.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807-813.
- Dai, S.M., Gill, S.S., 1993. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 273-283.
- De Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 35 (2): 233-240.
- De Maagd R A, Bravo A, Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17:193–99.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore and H. E. Schenpf. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409-433.
- Díaz-Mendoza, M., Farinós, G.P., Castañera, P., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., 2007. Proteolytic processing of native Cry1Ab toxin by midgut extracts and purified trypsins from the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.* 53, 428-435.
- Dulmage, H.T., 1970. Insecticidal activity of HD-I, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 232-239.
- Escriche, B., González-Cabrera, J., Herrero, S., Ferré, J., 2001. La utilización de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida. *Phytoma España* 129, 40-44.
- Federici, B.A., 2005. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol.* 89, 30-38.
- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR. 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta. Crystallogr. D* 57:1101–9.

- Ferré, J., Van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533.
- Glare, T. R. y M. O'Callaghan. 1998. Environmental and Health Impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Ministry of Health of New Zealand. pp. 13.
- Glare, T. R. y M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety, 1 ed. John Wiley & Sons, Ltd.,
- Goldberg, L. J., Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37:355-358.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254:447-464.
- Haider, M.Z., Knowles, B.H., Ellar, D.J., 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. colmeri insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.* 156, 531-540.
- Hammond, B. 2007. Food safety of proteins in agricultural biotechnology. CRC Press, Boca Raton (EEUU). pp. 51
- Hannay, C.L., and P.C. Fitz-James. 1955. The protein-crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Canad. J. microbial.* 1:694-710.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillot, C., Toprak, U., 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 285-302.
- Hernández, C.S., Andrew, R., Bel, Y., Ferré, J., 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *J. Invertebr. Pathol.* 88, 8-16.
- Höfte, H., Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Ibarra, J.E., Federici, B.A., 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 165, 527-533.

- Ibarra, J. E. y J. E. López-Meza. 1997. Desarrollo de Resistencia Hacia *Bacillus thuringiensis*. *Agrociencia* 31: 121-131.
- Ibarra, J. E. y Del Rincón – Castro, M. C. (2001). Cuantificación toxicológica de *Bacillus thuringiensis* en: *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas* (Caballero, P. y Ferré, J.). Phytoma – España pp. 133 – 152.
- Ibarra, J.E., Del Rincón, M.C., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C.M., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Sánchez, J., Peña, G., Bravo, A., 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5269-5274.
- Iriarte, J., Porcar, M., Lecadet, M., Caballero, P., 2000. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. *Curr. Microbiol.* 40, 402-408.
- Iriarte, J., y P. Caballero. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero P. y J. Ferré (Eds), *Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas*. Phytoma-España, Navarra, España, pp. 15-44.
- Ishiwata, S., 1901. On a severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* 114, 1-5.
- Jenkins, J. N. 1999. Transgenics plants exoressing toxins from *Bacillus thuringiensis*. From: *Methods in Biotechnology*, vol. 5: *Biopesticides: Use and delivery*. F. R. Hall and J. J. Menn (Ed). Huan Press Inc. Ttowa. NJ. Pp.211-231.
- Johnson, D.E., McGaughey, W.H., 1996. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Curr. Microbiol.* 33, 54-59.
- Joung, K. B. y J. C. Côté. 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Technical bulletin no. 29. Agriculture and Agri-food Canada. Horticultural R & D Centre, Saint-Jean-sur-Richelieu (Canada).

- Juárez-Pérez, V. 2004. Genética y Biología molecular de *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 17-47.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A., 1996. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIc. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 365-373.
- Khyami-Horani, H., Hajaj, M. y Charles, J. F. (2003). Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *jordanica* (serotype H71), a novel serovariety isolated in Jordan. *Curr Microbiol* 47(1): 26-31.
- Krieg, A. (1983). *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 96: 500-8.
- Kumar, N.S., Venkateswerlu, G., 1998. Endogenous protease-activated 66-kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* active against *Spodoptera littoralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 113-120.
- Lambert, B., Höfte, H., Annys, K., Jansens, S., Soetaert, P., Peferoen, M., 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2536-2542.
- Lecadet, M.-M., et D. Martouret. 1962. La toxina figure de *Bacillus thuringiensis*. Production enzymatique de substances solubles toxiques par injection. *CR Habd. Sc. Acad. Sc. Paris.* 254: 2457.
- Lecadet, M.-M., et D. Martouret. 1965. The enzymatique hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Berliner crystals, and the liberation of toxic fractions of bacterial origin by the chyle of *Pieris brassicae* (L.). *J. Invertebr. Pathol.* 7: 105-108.
- Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., Thiery, I., 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 660-672.

- Li, J., J. Carroll, and D. J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821.
- Li, J., Koni, P.A., Ellar, D.J., 1996. Structure of the mosquitocidal δ-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* 257, 129-152.
- Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B., Ellar, D.J., 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 571-577.
- Lightwood, D.J., Ellar, D.J., Jarrett, P., 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 66,5174-5181.
- Liu, Y.B., Tabashnik, B.E., Moar, W.J., Smith, R.A., 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1385-1389.
- Manceva, S.D., Pusztai-Carey, M., Russo, P.S., Butko, P., 2005. A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry* 44, 589-597.
- Martin, P. A. y Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 55(10): 2437-42.
- Mattes, G., 1927. Parasitare Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologische Bekämpfungsmittel. (Zugleich ein Beitrag zur Zytologie der Bakterien.) *Gesell. Beford. Gesam. Naturw. Sitzber. Marburg*, 62:381-417.
- McGaughey, W.H., 1994. Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Ecosystems Environ.*, 49: 95-102.
- Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9:409–417.

- Nester, E., Thomashow, L.S., Metz, M., Gordon, M. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment. Recurso en línea: <http://www.asmtusa.org>
- Oppert, B., 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. Arch. Insect Biochem. Physiol 42, 1-12.
- Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 255-281.
- Pinto, L. M., Azambuja, A. O., Diehl, E. y Fiuza, L. M. (2003). Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). Braz J Biol 63(2): 301-6.
- Porcar, M., Juárez-Pérez, V.M., 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiol. Rev. 26, 419-432.
- Porcar, M. y V. Juárez-Pérez. 2004. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 69-100.
- Promdonkoy, B., W. Pathaichindachote, C. Krittanai, M. Audtho, N. Chewawiwat, and S. Panyim. 2004. Trp132, Trp154, and Trp157 are essential for folding and activity of a Cyt toxin from *Bacillus thuringiensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 317: 744–748.
- Promdonkoy, B., Rungrod, A., Promdonkoy, P., Pathaichindachote, W., Krittanai, C., Panyim, S., 2008. Amino acid substitutions in alphaA and alphaC of Cyt2Aa2 alter hemolytic activity and mosquito-larvicidal specificity. J. Biotechnol. 133, 287-293.
- Raps, A., Kehr, J., Gugerli, P., Moar, W. J., Bigler, F. y Hilbeck, A. (2001). Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. Mol Ecol 10(2): 525-33.
- Rees, J.S., Jarrett, P., Ellar, D.J., 2009. Peritrophic membrane contribution to *Bt* Cry delta-endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. J. Invertebr. Pathol. 100, 139-146.

- Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H., 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J. Microbiol. Biotechnol. 17, 547-559.
- Rukmini, V., Reddy, C.Y., Venkateswerlu, G., 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. Biochimie 82, 109-116.
- Salehi Jouzani GR, Komakhin RA, Piruzian ES (2005) Comparative study of the expression of the native, modified, and hybrid cry3a genes of *Bacillus thuringiensis* in prokaryotic and eukaryotic cells. Russ J Genet 41(2):116–121.
- Sayed, A.H., Crickmore, N., Wright, D.J., 2001. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5859-5861.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806.
- Shelton, A. M., Zhao, J. Z. y Roush, R. T. (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. Annu Rev Entomol 47: 845-81.
- Siegel, J. P. (2001). The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. J Invertebr Pathol 77(1): 13-21.
- Smith, R. A., and G. A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Appl. Environ. Microbiol. 57:311-315.
- Sneath, P. H. A. et al. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins. Baltimore. Vol.2, pp. 1105, 1106, 1135.
- Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A., 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? Cell Mol. Life Sci. 66, 1337-1349.
- Stewart, G.S.A.B., Johnstone, K., Hagelberg, E., Ellar, D.J., 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. Biochem. J. 198, 101-106.

- Tabashnik, B. E., N. Finson, and M. W. Johnson. 1991. Managing Resistance to *Bacillus thuringiensis*: Lessons from the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 84: 49-55.
- Turner, J.T., J.S. Lampel, R.S. Stearmen, G.W. Sundin, P. Gunyuzul and J.J. Anderson. 1991. Stability of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xily* subsp. *cynodontis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3522-3528.
- Van Frankenhuyzen K (1993) The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs SR (eds) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Wiley, Chichester, pp 1–35
- Van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 1-16.
- Waalwijk, C., A. Dullemans, and C. Maat. 1991. Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 77: 257-264.
- Wasano, N., Yasunaga-Aoki, C., Sato, R., Ohba, M., Kawarabata, T., Iwahana, H., 2000. Spherical parasporal inclusions of the lepidoptera-specific and coleopteraspecific *Bacillus thuringiensis* strains: a comparative electron microscopic study. *Curr. Microbiol.* 40, 128-131.
- Wei, J. Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S. C. y Aroian, R. V. (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2760-5.
- Whalon, M. E. y Wingerd, B. A. (2003). Bt: mode of action and use. *Arch Insect Biochem Physiol* 54(4): 200-11.
- Wirth, M.C., Zaritsky, A., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Khasdan, V., Boussiba, S., Walton, W.E., 2007. Cross-resistance spectra of *Culex quinquefasciatus* resistant to mosquitocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* towards recombinant *Escherichia coli* expressing genes from *B. thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environ. Microbiol.* 9, 1393- 1401.

- Whiteley, H. R. and H.E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1986: 40:549-76. Review.
- World Health Organization. 1999. Guidelines specification for bacterial larvicides for public health use. Publication W. H. O./CDS/CPC/WHOPES/99.2. Report of the W. H. O. Informal Consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Zhang, J., Hodgman, T.C., Krieger, L., Schnetter, W., Schairer, H.U., 1997. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 179, 4336-4341.
- Zhou, X., Huang, Q., Chen, S., Yu, Z., 2005. Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and Red soil. *Appl. Clay Sci.* 30, 87-93.

ANEXO I

Extracción de DNA de *Bacillus thuringiensis*

A todas las cepas se les extrajo el DNA total mediante la técnica de Rosso, 1997.

1. Obtener un precultivo bacteriano en 2 ml de medio LB (Luria-Bertoni) a 28 °C con agitación a 250 rpm/1 noche.
2. Centrifugar a 1300 rpm/5 min., tirar el sobrenadante.
3. Resuspender la pastilla en 300 µL de amortiguador "J" y centrifugar 5 min. a 1300 rpm, tirar el sobrenadante.
4. Resuspender la pastilla en 120 µL de amortiguador "J".
5. Adicionar 12 µL de lisozima (40 mg/ml).
6. Incubar 30 min. A 37 °C.
7. Adicionar 6 µL de SDS al 20 %
8. Incubar 20 min. A 70 °C, dejar llegar lentamente a 50 °C.
9. Adicionar 1.5 µL de RNAsa (10 mg/ml).
10. Adicionar 3.6 µL de proteinasa K (10 mg/ml).
11. Incubar a 55 °C/1 noche
12. Adicionar 34.5 µL de NaCl 5M.
13. Agitar suavemente en hielo por 15 min.
14. Centrifugar a 1300 rpm/20 min.
15. Recuperar el sobrenadante.
16. Precipitar con el mismo volumen de isopropanol.
17. Centrifugar a 1300 rpm/20 min., tirar el sobrenadante.
18. Lavar la pastilla con etanol al 70 % (100 µL aproximadamente) y secar al ambiente.
19. Resuspender el DNA en 30 µL de agua destilada estéril.

ANEXO II

Obtención de espora-cristal de *Bacillus thuringiensis*

1. Sembrar en leche peptonizada, incubar a 28°C a 2500 rpm. Revisar a las 48 horas para observar si ya hubo autólisis.
2. Una vez autolizadas, verter el cultivo de los matraces a botellas plásticas con tapa, equilibrar los volúmenes y lavar ¡UNA SOLA VEZ! En la centrifuga de enfriamiento a 4 000 rpm a 4°C durante 15 min. Desechar el sobrenadante y vortexear la pastilla resuspendiendola en 10 ml de agua destilada estéril.
3. Transferir el sobrenadante que contiene la pastilla a tubos de centrifuga con tapa, lavar ¡TRES VECES! Centrifugando a 13 000 rpm/10 min. ¡IMPORTANTE VORTEXEAR EN CADA LAVADA!
4. Cubrir los tubos con papel parafilm, haciendo perforaciones para permitir la oxigenación y guardar a -20°C. Listos para liofilizar.