

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE CEPAS ATÍPICAS DE *Bacillus thuringiensis* HACIA INSECTOS DE LOS ORDENES Lepidóptera, Díptera y Coleóptera.

Armando Gutiérrez Agustín

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre de 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE CEPAS ATÍPICAS DE *Bacillus thuringiensis* HACIA INSECTOS DE LOS ORDENES Lepidóptera, Díptera y Coleóptera.

Armando Gutiérrez Agustín

Tesis

*Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador Como requisito Parcial Para
Obtener El Título De:*

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Dr. Gabriel Gallegos Morales
Presidente del Jurado

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo
Vocal

MC Sofia Comparán Sánchez
Vocal

Biol. Miguel Agustín Carranza Pérez
Suplente

Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo
Coordinador de La División de Agronomía.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2008
Coordinación.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE CEPAS ATÍPICAS DE *Bacillus thuringiensis* HACIA INSECTOS DE LOS ORDENES Lepidóptera, Díptera y Coleóptera.

Armando Gutiérrez Agustín

Tesis

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador

Como requisito Parcial Para Obtener Título De:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Dra. María Cristina Del Rincón Castro

Director de Tesis

Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor Interno

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2008

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioinsecticidas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Campus Irapuato. Guanajuato, bajo la asesoría de la Dra. M^a. Cristina Del Rincón Castro a quien agradezco permitirme ser parte de esta investigación y de dirigir este trabajo de tesis. Además de la amistad y confianza.

Al Dr. Jorge E. Ibarra Rendón, un infinito agradecimiento por su apoyo invaluable y aceptarme en el Laboratorio de Bioinsecticidas; primero como alumno de prácticas profesionales y posteriormente como Tesista, pero ante todo, gracias por su amistad y confianza.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por permitirme su confianza y ser parte del consejo examinador de este trabajo, además por su amistad brindada desde mis primeros años en la UAAAN.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo, por permitirme su confianza y ser parte del consejo examinador de este trabajo, además por su amistad brindada.

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” mi agradecimiento profundo, Fue, Es y Será; Mi “**ALMA TERRA MATER**”. Aquí conocí Grandes Amigos, Maestros, pero sobre todo Grandes Personas. A los maestros del Departamento de Botánica gracias por su paciencia.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Campus Irapuato. Guanajuato. Por permitirme la estancia en el Laboratorio de Bioinsecticidas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica.

A la MC. Regina Basurto, gracias por su paciencia, comprensión. A Peter y Cesar, gracias por su amistad desinhibida. A Javier, Katy y Magy (la comunidad del Insectario).

Un agradecimiento especial **a un ser Extraordinario**; que busco las palabras para describir mi gratitud pero nunca alcanzarían la dimensión de ella. **Gracias Mama: Emelia Agustín De Olarte. Gracias a mis Hermanos y Amigos.**

ÍNDICE GENERAL	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
Características de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
Taxonomía de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
Biología de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
Proteínas tóxicas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
δ -endotoxinas.....	9
Estructura de la δ -endotoxinas.....	11
Modo de acción de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
β -exotoxinas.....	15
Proteínas Cyt.....	15
Otras toxinas.....	17

Patología de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
Genética y biología molecular de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
Plásmidos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
Evaluación del efecto insecticida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
Teoría del bioensayos.....	21
Parámetros estadísticos del análisis Probit.....	22
Requerimientos estadísticos de los bioensayos con <i>Bacillus thuringiensis</i> para el análisis Probit.....	23
Factores que influyen sobre el bioensayos.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Ubicación del área de estudio.....	25
Cepas de estudio.....	25
Cultivo y purificación de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
Mantenimiento de las colonias de insectos para la evaluación tóxica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
Mantenimiento de la colonia de <i>Manduca sexta</i>	27
Mantenimiento de la colonia de <i>Aedes aegypti</i>	29
Mantenimiento de la colonia de <i>Leptinotarsa texana</i>	30
Bioensayos.....	31
Bioensayos contra <i>Manduca sexta</i>	31
Bioensayo contra <i>Aedes aegypti</i>	33
Nuevo método de bioensayo contra <i>Aedes aegypti</i>	35
Bioensayo contra <i>Leptinotarsa texana</i>	35
Determinación de perfiles proteicos.....	37

Extracción de plásmidos.....	38
Determinación de perfil de plásmidos.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Evaluación de la toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
Estimación de la toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra <i>Manduca sexta</i> ...	39
Estimación de la toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra <i>Aedes aegypti</i>	42
Estimación de la toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra <i>Leptinotarsa texana</i>	45
Perfil de proteínas.....	46
Perfil de plásmidos.....	48
CONCLUSIONES.....	52
LITERATURA CITADA.....	53
APÉNDICE.....	59

ÍNDICE CUADROS

Página

Cuadro. 1	Clasificación de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
Cuadro. 2	Descripción de cepas atípicas de <i>Bacillus thuringiensis</i> del Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-Irapuato utilizadas en este estudio.....	25
Cuadro. 3	Concentraciones utilizadas para estimar la CL ₅₀ de la cepa LBIT-1189.....	39
Cuadro. 4	Concentración Letal Media de la cepa LBIT-1189 tóxica para <i>Manduca sexta</i>	40
Cuadro. 5	Concentración Letal Media de la cepa LBIT-1189 para <i>Manduca sexta</i>	41
Cuadro. 6	Concentraciones utilizadas para estimar la CL ₅₀ de la cepa LBIT-980.....	42
Cuadro. 7	Concentración Letal Media (CL ₅₀) de la cepa LBIT-980 tóxica hacia <i>Aedes aegypti</i>	42
Cuadro. 8	Concentración Letal Media de la cepa LBIT-980 tóxica para <i>Aedes aegypti</i>	44
Cuadro. 9	Cepas tipo de <i>Bacillus thuringiensis</i> y su contenido de plásmidos.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Fig. 1	Mecanismo de acción de la toxina Cry.....	14
Fig. 2	Mecanismo de acción de la toxina Cyt.....	17
Fig. 3	Limites Fiduciales, Inferior y Superior de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) de la toxicidad de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas de primer instar de <i>Manduca sexta</i>	40
Fig. 4	Relación de la dosis espora-cristal de <i>B. thuringiensis</i> contra la mortalidad causada hacia <i>Manduca sexta</i> , (concentración no transformada y transformada a log).....	41
Fig. 5	Limites Fiduciales, Inferior y Superior de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) de la toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra larvas de cuarto instar temprano de <i>Aedes aegypti</i>	43
Fig. 6	Relación de la concentración del complejo espora-crista de <i>B. thuringiensis</i> con la mortalidad causada en la evaluación toxica contra <i>Aedes aegypti</i> , (concentración no transformada y transformada a log).....	43
Fig. 7	Electroforésis de proteínas en gel de poliacrilamida de las cepas carril 1) M: Marcador de paso molecular, LBIT-113 a LBIT-956.....	47
Fig. 8	Electroforésis de proteínas en gel de poliacrilamida de las cepas carril 1) M: Marcador de peso molecular, de LBIT-976 a LBIT-1189.....	47
Fig. 9	Análisis electroforético de plásmidos en gel de agarosa al 0.5% de las cepas en estudio, Carril 1) M: Marcador de peso molecular, LBIT-113 a LBIT-955.....	49
Fig. 10	Análisis electroforético de plásmidos en gel de agarosa al 0.5% de las cepas, Carril; 1) M: Marcador de peso molecular, LBIT-956 a LBIT-1189.....	50

RESÚMEN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN-Irapuato, Gto. Méx. (CINVESTAV). En este trabajo se evaluó, la actividad tóxica de cepas atípicas de *B. thuringiensis* hacia insectos de los órdenes de Lepidóptera, Díptera y Coleóptera. (*Manduca sexta*, *Aedes aegypti* y *Leptinotarsa texana*). Se evaluaron quince cepas atípicas de *B. thuringiensis* y se caracterizaron mediante la estimación de su Concentración Letal Media (CL₅₀), el patrón de plásmidos, su perfil de proteínas. Se encontró toxicidad para la cepas LBIT-980 y LBIT-1189, con efecto hacia *Aedes aegypti* y *Manduca sexta* respectivamente, con las cuales se estimó una CL₅₀ de 5.605 µg/ml para *Aedes aegypti* y para *Manduca sexta* una CL₅₀ de 0.0.309 µg/cm², cuando se utilizaron larvas de primer instar de *M. sexta* y de cuarto instar para *A. aegypti*, Las cepas presentaron patrones de plásmidos diferentes, aunque los 2 de las cepas LBIT-27 y LBIT-193, presentaron cierta similitud con respecto al de la cepa estándar HD-1. El patrón de plásmidos de las cepas en estudio y que son de interés toxico fue totalmente diferente. El patrón de proteínas de igual forma fue diferente pero se observan claramente bandas de 130, 95 y 65 kDa para la cepa LBIT-1189 y un cristal de forma bipiramidal, características del Patotipo I, con actividad hacia Lepidópteros. Mientras que para la cepa LBIT-980 se observa ligeramente bandas de 128, 65 y 27 kDa, características del Patotipo II, además de un cristal semiesférico, típico con actividad hacia Dípteros. Las cepas que resultaron tóxicas muestran potencial para desarrollarse como bioinsecticidas contra *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*, en México.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus thuringiensis*, *Manduca sexta*, *Aedes aegypti*, bioensayos, plásmidos, δ-endotoxinas, proteínas Cry.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen agentes entomopatógenos en los que se incluyen bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoos, estos se caracterizan por su toxicidad sobre algunas especies de artrópodos en especial a los de la clase Insecta y otros organismos. Estos, mismos organismos, se cultivan en condiciones de laboratorio y se formulan para la aplicación como insecticidas convencionales, y son conocidos como insecticidas biológicos o bioinsecticidas.

La utilización de bacterias entomopatógenas para el control de insectos es una alternativa viable desde el punto de vista práctico y económico, ya que se pueden reproducir en grandes y pequeñas cantidades, por ello es necesario llevar a cabo un buen control de insectos con dichos bioinsecticidas, además de un buen conocimiento sobre selección de cepa, para seleccionar aquellas que sean patogénicas y virulentas, además que se adapten a condiciones ecológicas específicas.

La bacteria *B. thuringiensis*, está caracterizada por producir inclusiones paraesporales, denominadas δ -endotoxinas, con actividad tóxica sobre algunas especies de insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Himenóptera, Ortóptera y contra otros organismos, como ácaros, nematodos y platelmintos (Feitelson *et al.*, 1992). Desde su descubrimiento, *B. thuringiensis* se ha convertido en el entomopatógeno más utilizado a nivel mundial, con ventas que representan más de 90% del mercado de bioplagicidas, y además es aprovechado para obtener plantas resistentes a insectos (Schnepf *et al.*, 1998).

En los últimos años ha surgido gran interés por disminuir el uso de plaguicidas o insecticidas de origen químico, ya que el uso indiscriminado de estos productos ha ocasionado grandes estragos en el ambiente y la salud humana. Por lo que hoy en día el control químico de plagas ha dejado de ser eficiente y atractivo en esta última década, y se ha podido observar que la erradicación de plagas no se logró y por el contrario han aumentado los problemas. No solo se han incrementado grandemente el número de insectos con resistencia, sino además la extensión y la severidad; un ejemplo de ello, en varias poblaciones de *Plutella xylostella* y *Leptinotarsa decemlineata*, se ha reportado la resistencia implícitamente a todos los insecticidas y esto ha creado un reto en vista de las

dificultades presentes en descubrir y, en particular, desarrollar nuevas alternativas de control (Denholm y Rowland, 1992). La problemática antes mencionada ha creado una presión para producir nuevos productos que reúnan las características de selectividad, efectividad biológica y económica, además de seguridad y compatibilidad ambiental, para controlar plagas que continuamente se generan. La nueva alternativa la constituye la diversidad de insecticidas biológicos también conocidos como bioinsecticidas (Cannon, 1989).

Entre los bioinsecticidas más utilizados y de gran efectividad esta *B. thuringiensis*, además del uso en la agricultura está siendo utilizado para el control de vectores de enfermedades como mosquitos y moscas negras. Dicha bacteria constituye una buena alternativa para el control de plagas, ya que es inocua al hombre, animales, flora y fauna silvestre; presenta efectos específicos a larvas de lepidópteros, dípteros y coleópteros que son plagas de importancia económica por las grandes pérdidas que representan. Su obtención como un producto comercial la convierte en un bioinsecticida económico; presenta estabilidad en su forma de producto seco añadiendo estabilizadores y protectores solares; y es compatible con otros agentes de control, tanto biológicos como químicos (Rowe y Margaritis, 1987).

La actividad bioinsecticida de *B. thuringiensis* radica en una proteína paraesporal o cuerpo de inclusión (cristal). La inclusión está constituida por proteínas denominadas δ -endotoxinas (Manasherob, *et al.*, 1998). Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios (Fernández-Larrea, 1999).

Probablemente los organismos entomopatógenos y sus toxinas no sean la solución pero si una alternativa para abatir la problemática de la agricultura moderna contra toda la gama de plagas que se presentan a cada día, por ello las instituciones de investigación buscan nuevas técnicas para una aplicación práctica y efectiva, y además seleccionar las técnicas que hagan posible obtener patógenos con mayor capacidad tóxica, además que presenten un rango de hospederos totalmente diferentes a los ya conocidos.

OBJETIVOS

3. 1. Objetivo general.

Caracterizar a nivel de actividad biológica y genética quince cepas atípicas de *Bacillus thuringiensis* hacia insectos de los ordenes; Lepidóptera, Díptera y Coleóptera.

Objetivos específicos.

- a) Determinar los niveles de toxicidad de cepas atípicas de *Bacillus thuringiensis* hacia insectos de los ordenes Lepidópteros, Dípteros y Coleópteros, bajo condiciones de laboratorio.
- b) Realizar bioensayos burdos (efecto o no efecto) para cada una de las quince cepas de *Bacillus thuringiensis* contra larvas de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti* y *Leptinotarsa texana*.
- c) Establecer la CL₅₀ mediante bioensayos cualitativos de las cepas de *Bacillus thuringiensis* que presentaron actividad tóxica contra larvas de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti* y *Leptinotarsa texana*.
- d) Determinar el perfil de plásmidos mediante geles electroforéticos de agarosa para cada cepa de *Bacillus thuringiensis* probada.
- e) Determinar el perfil de proteínas mediante geles electroforéticos de poliacrilamida para cada cepa de *Bacillus thuringiensis* analizada.

REVISION DE LITERATURA

Historia de *Bacillus thuringiensis*.

Algunos indicios llevan a pensar que en el antiguo Egipto se conoció la acción insecticida de lo que probablemente fue *B. thuringiensis*, y que se usó en el control de plagas (Nester *et al.*, 2002). *B. thuringiensis* fue descubierta por Shigetane Ishiwata en el año de 1901, en Japón, quien la aisló a partir de una larva muerta del gusano de seda (*Bombix mori*) denominándola *Bacillus soto*.

Su identificación como agente entomopatógeno, y su clasificación, se deben a su reaislamiento por Berliner en el distrito de Thuringia (Alemania), a partir de larvas muertas de la palomilla de la harina *Ephestia kuhniella* Z.

De León-Hernández (1994) menciona que hacia 1938 se desarrollo en Francia un producto a base de *B. thuringiensis* bajo el nombre de “Sporine”, el cual se utilizó para controlar a *Ephestia kuhniella*. Más tarde se estableció que la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* se debía a inclusiones cristalinas.

El aislamiento de varias cepas de *B. thuringiensis* a principios de los años 50, unido al hecho de que entre ellas presentaban diferencias morfológicas y bioquímicas, creó la necesidad de establecer una clasificación. En 1962, De Barjac y Bonnefoi propusieron un método para la clasificación de los diferentes aislamientos basado en la aglutinación de los antígenos flagelares (serotipo H) realizada con anticuerpos específicos. Debido a que esta clasificación presentó reproducibilidad, fiabilidad, rapidez y ningún tipo de ambigüedad es la que se acepta oficialmente, aunque no existe una correlación directa entre el serotipo de la cepa, el cristal producido, y por lo tanto, en su actividad biológica. En 1964, Norris demostró que se pueden diferenciar a las cepas de *B. thuringiensis* comparando los perfiles de migración electroforética de las esterazas producidas por la bacteria en la fase vegetativa de crecimiento. Interesantemente, se observó una buena correlación con la clasificación por serotipificación (Rowe y Margaritis 1987).

La nomenclatura oficial de los cristales fue propuesta por Heimpele (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. Hacia 1976, Krywienczyk presentó la caracterización de las cepas de *B. thuringiensis* en función de los antígenos específicos de los cristales purificados, que demostró la existencia de diferentes tipos de cristal (Höfte y Whiteley, 1989).

Höfte y Whiteley en 1989, presentaron una clasificación basada en la estructura de la proteína deducida a partir de la secuencia del Ácido Desoxirribonucleico (DNA). Varias secuencias son idénticas, o muy parecidas, demostrando que son variantes de un mismo gen y tomando esto en cuenta se agruparon dentro de cuatro clases mayores, que son: Cry I activas contra lepidópteros, Cry II activas contra lepidópteros y dípteros, Cry III activas contra coleópteros, y Cry IV activas contra dípteros y una clase no relacionada de proteína Cyt con actividad mosquitocida y citolítica (Höfte y Whiteley, 1989). Sin embargo, el descubrimiento de 29 nuevos genes que codifican para proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* originó la adición de dos clases más: Cry V y Cry VI contra nematodos (Feitelson *et al.*, 1992).

El espectro de proteínas conocido se expandió rápidamente y hasta 1995 existían 51 secuencias de proteínas Cry reportadas por Schnepf. Debido a esto se presentaron inconsistencias en el esquema original de nomenclatura, por la dificultad de acomodar genes altamente homólogos a secuencias conocidas pero que no codificaban una toxina con espectro de acción similar. En 1998 Crickmore y colaboradores propusieron una nomenclatura basada en el grado de divergencia evolutiva y de secuencia de aminoácidos lo que permite entrever su actividad evitando la necesidad de realizar bioensayos múltiples y engorrosos para definir su función y poder asignarle un nombre. A la fecha se encuentran 332 δ -endotoxinas clasificadas dentro de 47 grupos de proteínas Cry, 22 proteínas Cyt en 2 grupos, y 6 proteínas de *B. thuringiensis* a las que se les ha dado un nombre ambiguo debido a datos insuficientes o inciertos de su secuencia y por lo tanto no ha sido posible clasificarlas dentro de un grupo específico (Crickmore *et al.*, 2005).

Importancia de *Bacillus thuringiensis*.

El poder insecticida de la bacteria *B. thuringiensis* reside en un cuerpo de naturaleza proteica, llamada cristal o cuerpo paraesporal que es el que contiene la δ -endotoxina. Este es producido durante la fase de esporulación resultando tóxico cuando es ingerido por insectos susceptibles como Lepidópteros, Dípteros y Coleópteros.

Los cristales de *B. thuringiensis* contienen proteínas insecticidas que se utilizan para la formulación de bioinsecticidas y los genes *cry* se aíslan para producir, mediante ingeniería genética, plantas resistentes a insectos.

En la actualidad esta bacteria es la base de un gran número de bioinsecticidas que, por sus características de selectividad y especificidad, han comenzado a reemplazar a los insecticidas convencionales en la lucha contra plagas de interés agrícola, forestal y veterinario (Aldebis *et al.*, 1994). Además se han encontrado nuevas cepas con actividad tóxica hacia, Himenópteros, Homópteros, Ortópteros, Malófagos, y contra organismos como ácaros, platelmintos y nemátodos, incluso han mostrado actividad sobre células cancerígenas, leucémicas y contra protozoos de importancia médica como *Giardia lamblia* y *Plasmodium berghei* (Beegle y Yamamoto, 1992; Feitelson *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2004).

B. thuringiensis es la bacteria entomopatógena más ampliamente utilizada como bioinsecticida, sola o en combinación con pesticidas químicos, en la protección de especies vegetales, agricultura comercial y contra dípteros vectores de enfermedades humanas (malaria, dengue, fiebre amarilla) (Nester *et al.*, 2002). Todos estos aspectos prácticos son los que han impulsado a buscar nuevas cepas con el objetivo de ampliar su acción insecticida hacia otros órdenes de insectos.

Características de *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis es una bacteria gram positiva, ubicua de forma bacilar, esporuladora, aeróbica facultativa, de un tamaño que oscila entre 1 a 1.2 micras de ancho, y de 3 a 5 micras de largo, nativa del suelo, ampliamente distribuida en el ambiente, perteneciente al orden Eubacteriales, familia *Bacillaceae*, grupo I del género *Bacillus* (Ruiz

et al., 2004). Una colonia aislada de *B. thuringiensis*, en caja de Petri, muestra una morfología circular, de color crema, con aspecto harinoso y textura semejante a la cera. La observación al microscopio óptico de contraste de fases, de un cuerpo paraesporal refringente durante la fase de esporulación permite su diferenciación de otras especies del complejo *Bacillus* (Ruiz, *et al.* 2004). Las esporas son ovales en posición subterminal y no deforman el esporangio. Una de las características más importantes de *B. thuringiensis* es la de sintetizar, durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento, una inclusión paraesporal de naturaleza proteica denominada inclusión cristalina, cristal o δ -endotoxina (Schnepf *et al.*, 1998). La estructura de esta inclusión es el resultado del ensamblaje de varias unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, que oscilan entre 27 y 140 kilodaltones (kDa), las cuales le dan su forma característica (Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998).

La actividad insecticida y el espectro de acción de *B. thuringiensis* está determinado por las proteínas tóxicas, además la mayoría de los serotipos y variedades de cepas presentan el cuerpo paraesporal con variación en forma, tamaño y espectro de acción; y en base a esto se propuso dividirlos en patotipos (De León-Hernández, 1994).

Taxonomía de *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis es una bacteria perteneciente a la familia *Bacillaceae* del genero *Bacillus*, situado taxonómicamente dentro del grupo de Bacilos Gram positivos formadores de una endoespora, dentro de especies con flagelación peritrica. *B. thuringiensis* está dentro del grupo I del género, que es donde se encuentran aquellas especies con espora elipsoidal que no provocan hinchamiento del perfil bacilar. La principal diferencia de *B. thuringiensis* con respecto a otros Bacilos relacionados es la formación, durante la fase de esporulación, de uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacentes a la espora, y algunos de estos cristales resultan tóxicos para algunas especies de insectos, con alta eficiencia y especificidad y bajo impacto sobre el medio ambiente. El cristal presenta una gran diversidad de formas dependiendo de la proteína que lo constituya, encontrándose cristales bipiramidales, cúbicos, romboidales, esféricos, rectangulares, triangulares e irregulares, y con tamaños variados (Iriarte y Caballero, 2001).

Entre los aislados de *B. thuringiensis* existen diferencias que hacen necesario establecer un criterio de clasificación. Iriarte y Caballero, (2001) mencionan que las primeras propuestas de clasificación se hicieron a finales de los 50, basadas en la morfología y bioquímica de los aislados. Más tarde surgieron nuevas técnicas de caracterización basadas en la susceptibilidad a distintos bacteriófagos, la producción de antibióticos, la serología del cristal, la presencia de genes tóxicos y perfil de plásmidos. Hoy en día sigue siendo una técnica fiable y específica que ha permitido la identificación serológica de los distintos aislados.

Biología de *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis es habitante de muchos ambientes y se han aislado cepas de suelo, insectos, polvo de productos almacenados, residuos, hojas y coníferas. Las distintas cepas de *B. thuringiensis* se pueden encontrar en un gran número de ecosistemas terrestres diferentes, como desiertos, mesetas, bosque húmedo tropical, altas montañas, playas y cuevas entre muchos otros (Ibarra *et al.*, 2003; Schnepf *et al.*, 1998).

Las esporas de *B. thuringiensis* pueden sobrevivir por algunos años, aunque la población y la toxicidad declina rápidamente. Parece ser que *B. thuringiensis* no es altamente competitiva en relación a otros microorganismos, ya que al inocular esporas y cristales en suelo, se ha observado que la presencia y actividad se mantiene hasta por 3 años en suelos estériles, mientras que en suelos no estériles se pierde hasta el 50% de actividad en los primeros 7 días. Además de las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* posee la capacidad de producir otra serie de factores de virulencia como α y β exotoxinas, hemolisinas, inhibidores de inmunidad, flagelos y enzimas quitinasas, fosfolipasas y proteasas (Schnepf *et al.*, 1998).

El ciclo de *B. thuringiensis* comienza en la germinación de la espora, aunque se desconocen los requerimientos para la germinación en suelo, se sabe que en el intestino de los insectos el pH es alcalino, con un posterior crecimiento en la hemolinfa del insecto. Aunque el crecimiento se da entre los 15 y hasta los 45 °C, la temperatura óptima es entre los 26 y 30 °C, siendo su pH óptimo entre 6.5 y 7.5. (Iriarte y Caballero, 2001; Ruiz, *et al.* 2004).

Proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis*.

La bacteria *B. thuringiensis* se caracteriza por poseer una serie de toxinas que le han permitido infectar a diferentes organismos, entre las proteínas o factores de virulencia se encuentran fosfolipasas, proteasas, quitinasas, α -exotoxinas, o exotoxinas termolábiles, β -exotoxina o thuringensina, las proteínas Vip, que son proteínas insecticidas que se producen durante la fase vegetativa del crecimiento y las δ -endotoxinas, que son proteínas que se forman durante la fase de esporulación formando cristales paraesporales y que tienen diferente especificidad. Se han descrito algunas δ -endotoxinas con actividad frente a insectos del orden, lepidóptera, díptera, coleóptera, himenóptera y hacia algunos protozoos, ácaros e invertebrados (Bravo, 2001; Fernández-Larrea, 2002).

Las endotoxinas- δ o proteínas Cry son sintetizadas durante el proceso de esporulación, en la actualidad se conoce gran número de proteínas Cry ordenadas en grupos y subgrupos cada una de las cuales es tóxica para un determinado grupo de insectos susceptibles. Actualmente se estima que existen unas 40.000 variedades de cepas *B. thuringiensis* con especificidad para diferentes órdenes de insectos, dependiendo de las proteínas Cry que expresen.

Las β -exotoxinas no quedan incluidas en el cristal de la espora. También se les llama *thuringensinas*. Tienen una acción tóxica importante, pero debido que son tóxicas hacia vertebrados, su uso ha sido muy limitado.

Las proteínas vegetativas del grupo VIP son sintetizadas durante la vida activa de la bacteria. Su acción insecticida está siendo estudiada. Por ejemplo la proteína Vip3A tiene acción directa sobre algunos lepidópteros plaga común en la mayoría de los cultivos como, por ejemplo *Spodoptera frugiperda*.

δ -endotoxinas.

La toxicidad de *B. thuringiensis* está considerada por el tipo de proteínas que produce durante la fase de esporulación, proteínas llamadas δ -endotoxinas y que se creen

son una ventaja adaptativa frente a otras bacterias esporulantes, ventaja que le ha permitido colonizar hábitats de accesos restringidos, como lo es el interior de insectos.

El hábitat natural de *B. thuringiensis* es poco conocido sin embargo dado su requerimiento vitamínico y de algunos aminoácidos como glutámico, así como a su actividad bioinsecticida, se piensa que la forma de vida vegetativa solo se presenta en el interior de insectos que infecta hasta que esporula y es liberado al medio ambiente donde permanece en forma de esporas, lo que explica su amplia distribución (Schnepf *et al.*, 1998).

En especies de *Bacillus*, la endoespora se desarrolla en un esporangio que consiste de dos compartimentos celulares conocidos como la célula madre y la espora. Las proteínas insecticidas se acumulan en la célula madre durante el proceso de esporulación. Las diferentes etapas del proceso de esporulación y la acumulación del cristal insecticida se diferencian por la regulación de muchos genes en el tiempo y en el espacio a través de la utilización de múltiples factores sigma que se expresan a diferentes tiempos en los dos compartimentos (Bravo, 2001).

El proceso de formación de la espora puede dividirse en siete etapas o estadios; durante el estadio I se inducen los genes que iniciarán la esporulación. Este punto puede ser reversible si se adicionan nutrientes, y a partir del estadio II de esporulación, el proceso es irreversible y continuo hasta finalizar con la formación de la espora. En el estadio II, la bacteria forma un septo de división asimétrico. En el estadio III, se inicia la síntesis del cristal insecticida, la cual continuará hasta el final de la esporulación. La síntesis del cristal insecticida se da a partir de dos promotores que funcionan secuencialmente (Bt1 y Bt2). El primero es activado por sigma^E durante los estadios III y IV y el segundo por sigma^K durante los estadios V y VI. Durante estos pasos se lleva conjuntamente la formación de la espora. Finalmente en el estadio VII se sintetizan enzimas líticas que liberan a las esporas y los cristales insecticidas (Bravo, 2001; Iriarte y Caballero, 2001).

La síntesis de la inclusión cristalina representa de un 20-30 % de las proteínas formadas en el esporangio. El cuerpo paraesporal difiere en dimensión y forma. La mayoría de los serotipos, variedades y cepas conocidas presentan un cristal bipiramidal;

encontrándose este como el más abundante en la naturaleza y es el más ampliamente estudiado. En el año de 1976 se descubrió en Israel una cepa con actividad tóxica hacia dípteros, presentando un tipo de cristal amorfo y semiesférico, seis años mas tarde en Alemania se descubrió un tipo de cristal aplanado y semicuadrado con espectro tóxico hacia coleópteros (De León-Hernández, 1994).

La forma típica del cristal de *B. thuringiensis* es bipiramidal, constituido por subunidades alargadas formadas por dímeros de 230 kDa. Estos pueden ser desnaturalizados a monómeros de 130 kDa y estos polipéptidos pueden ser hidrolizados por medio de digestión enzimática e pH de 9.5-11, con lo que se obtiene una fracción de 60-70 kDa, la cual es estable y tóxica; esta fracción es conocida como δ -endotoxina (De León-Hernández, 1994).

Estructura de la δ -endotoxina.

La δ -endotoxina se encuentra compactada en inclusiones paraesporales visibles al microscopio de contraste de fases, además su estructura varía entre subespecies, así como del medio y condiciones en las cuales se desarrolle *B. thuringiensis*. También varía de acuerdo al gen que codifica la proteína. Las toxinas que se han identificado presentan tres tamaños de acuerdo a sus pesos moleculares. Las proteínas codificadas por los genes Cry I y Cry IV, Cry II, Cry III y Cry V y por los genes Cyt corresponden a proteínas de 125-138, 65-75 y 25-28 kDa de peso molecular (De León-Hernández, 1994).

Las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* muestran una estructura similar compuesta por tres dominios. El dominio I está constituido por siete hélices α antiparalelas y anfipáticas. Seis de éstas forman un ramillete que rodea a la hélice α 5. Éste dominio que forma el poro iónico. El dominio menos conservado en secuencia y estructura terciaria entre las toxinas Cry es el dominio II. Este dominio está formado por tres láminas plegadas β y por tres asas. En las asas de estas láminas β se observa la mayor diferencia estructural. El dominio II juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina, donde las asas interaccionan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio. El dominio III está formado por dos láminas plegadas β antiparalelas

formando un sándwich. El dominio III también está involucrado en la interacción con receptores (Bravo, 2001)

Las proteínas que se han propuesto como posibles receptores de las toxinas Cry1A en insectos lepidópteros son la aminopeptidasa N (APN) y una proteína de la familia de las caderinas (BtR). La APN es una proteína con masa aparente de 120 kDa que se encuentra anclada a la membrana a través de un grupo glicosilfosfatidil-inositol (GPI), mientras BtR tiene una masa de entre 175 a 210 kDa dependiendo del insecto lepidóptero. Por otra parte, en mosquitos identificamos una proteína anclada a través de un grupo GPI con actividad de fosfatasa alcalina de 65 kDa que interacciona con la toxina Cry11Aa (Fernández, *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la interacción de la toxina con el receptor caderina promueve un corte adicional del extremo amino terminal, facilitando la formación de un oligómero o pre-poro formado por cuatro monómeros que es el responsable de la inserción a la membrana y la formación del poro. Para que el pre-poro se inserte a la membrana, se requiere que interaccione con el receptor APN. Las proteínas ancladas a la membrana por GPI se distribuyen de manera preferencial en regiones específicas de la membrana, conocidas como *balsas lipídicas*, que tienen características particulares debido a su alto contenido de colesterol y glucolípidos. La interacción del pre-poro de la toxina Cry con la APN facilita la inserción del oligómero en las balsas lipídicas membranales, lo que resulta en la formación del poro (Bravo, *et al.*, 2004).

Modo de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

Para que se inicie la actividad o acción de las toxinas de *B. thuringiensis*, las protoxinas deben ser ingeridas por el insecto sensible, cuyo intestino tiene un pH elevado (alcalino), lo cual es esencial para la disolución de muchas protoxinas de *B. thuringiensis*. Estas son solubles solamente con pH superiores a 9.5. Las protoxinas son activadas por proteasas del intestino, las cuales llevan las protoxinas de 130 kDa a una toxina de 55-65 kDa, resistente a proteasa y que comprende la región N terminal de la protoxina (Fernández-Larrea, 2002; Bravo, 2001; Iriarte y Caballero, 2001).

La especificidad de la δ -endotoxina a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores específicos, la toxina se inserta de forma irreversible a la membrana plasmática de las células intestinales y posteriormente inicia la formación de un poro o lesión en la membrana que conduce a una variación en su permeabilidad alterando el transporte de los iones de potasio, lo cual trae como consecuencia la lisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto y las esporas bacterianas inician su multiplicación en la hemolinfa provocando una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas insecticidas (Fernández-Larrea, 2002; Del Rincón-Castro, *et al.*, 2006). Entonces las toxinas Cry de *B. thuringiensis* alcanzan su efecto formando poros líticos sobre las células del intestino medio del insecto susceptible, mientras que el mecanismo de acción de las toxinas Cyt difiere de las toxinas Cry.

Después de la ingestión del cristal por el insecto susceptible, las protoxinas son solubilizadas por las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto, en el caso de lepidópteros y dípteros (Bravo, 2004). Para las Cry3A, y otras toxinas de actividad contra coleópteros es necesario que la enzima tipo quimi tripsina corte la protoxina para su solubilización (Bravo, 2004; Schnepf *et al.*, 1998). Posteriormente en el proceso proteolítico las proteasas fragmentan las protoxina en segmentos de 55 a 65 kDa (Bravo, 2004), y se unen las toxinas activadas a receptores específicos sobre vesículas de membrana de la microvellosidad apical del insecto susceptible (Bravo, 2004; Carreras, *et al.*, 2003; Vargas, 2001), de estos receptores se encuentran caderinas, aminopeptidasa N (APN), fosfatasa alcalina y proteínas de 210 kDa de VMMA (Bravo, 2004; Schnepf *et al.*, 1998). El sitio que reconoce la toxina en la proteína de unión es un epítotope muy pequeño o un carbohidrato (Schnepf *et al.*, 1998). La unión fuerte involucra 2 estados que bien puede ser reversible (conteniendo únicamente los dominios II y III y la interacción únicamente con el carbohidrato) o irreversible (requiere la inserción del dominio I en la membrana apical y la interacción proteína-proteína) (Schnepf *et al.*, 1998).

Una vez que se ha dado la inserción dentro de la membrana apical, la toxina se vuelve insensible a las proteasas y anticuerpos monoclonales e induce canales de iones o poros no específicos con un diámetro de 1 a 2 nanómetros (nm) en la membrana celular a manera de oligómeros que rompen el potencial de membrana y muy probablemente la

agregación de δ -endotoxinas influye en este proceso (Bravo, 2004; Schnepf *et al.*, 1998). Este modelo propone que un flujo de agua, junto con iones, que resulta en un hinchamiento celular y eventualmente lisis en presencia de un ambiente altamente osmótico y de alto pH (8.8 a 9.6) (Bravo, 2004; Schnepf *et al.*, 1998). Considerando todo este proceso la muerte del insecto se da como consecuencia de la destrucción del intestino medio y por la septicemia subsiguiente a que las esporas de *B. thuringiensis* alcanzan la hemolinfa y germinan en ella (Bravo, 2004; De Maagd *et al.*, 2001; Schnepf *et al.*, 1998).

Podemos resumir las etapas de acción de las toxinas de *B. thuringiensis* según Niedmann y Meza, (2006) en los siguientes eventos: 1) ingesta del cristal proteico; 2) solubilización del cristal en un medio alcalino del intestino; 3) procesamiento proteolítico de la protoxina mediante la acción de proteasas endógenas; 4) unión de la toxina a receptores específicos del epitelio intestinal; y 5) formación de poros y lisis de las células epiteliales. De acuerdo a De Maagd *et al.*, (2001) el proceso de infección del insecto hospedero desde su ingesta de alimento a la muerte tiene un plazo de 2 a 6 días.

La sintomatología de las larvas que han ingerido el complejo espora-cristal son: inanición, parálisis total o parcial debido al cambio en el pH de la hemolinfa y germinación de la espora por la reducción en la alcalinidad del intestino medio, en ocasiones se presenta diarrea reduciendo el tamaño de la larva y con síntomas de necrosamiento en la parte media del cuerpo y finalmente la muerte (Soberón, *et al.*, 2007; De León-Hernández, 1994).

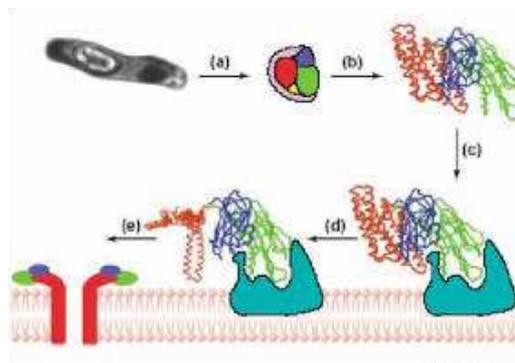


Figura. 1. Mecanismo de acción de la toxina Cry. a) Después de la ingestión por el insecto el cristal se solubiliza en el jugo intestinal, b) Proteasas intestinales que degradan el extremo C-terminal, c) La toxina activada (en este caso Cry1Aa) se une al receptor en la membrana celular, d) El rearrreglo estructural permite a las horquillas de 2 hélices insertarse en la membrana, e) La toxina forma poros de naturaleza aún desconocida (De Maagd *et al.*, 2001).

β -exotoxinas.

La β -exotoxina o thuringensina es una toxina no proteica, termostable, que se secreta dentro del medio de cultivo. Esta toxina no es específica y puede ejercer efectos dañinos en diferentes organismos inclusive especies benéficas. Es particularmente activa contra especies de dípteros, pero también es activa contra especies de coleópteros, lepidópteros y algunas especies de nematodos. Además su producción se asocia con los serotipos H1, H4, H8, H9 y H10 y a los serovares *thuringiensis*, *kurstaki*, *sotto*, *kenyae*, *galleriae*, *aizawai*, *morrison*, *tolworthi*, *darmastadiensis*, *toumanoffi*, *thompsoni* y *kumamotoensis* (Iriarte y Caballero, 2001; Fernández-Larrea, 2002).

Aunque el mecanismo de acción no está completamente dilucidado, se sabe que esta toxina es un análogo del nucleótido de adenina con un peso molecular de 701 Daltons que interfiere con la RNA polimerasa por competencia con el ATP. Se ha propuesto que esta molécula afecta la muda y pupación causando efectos teratológicos en dosis subletales. La β -exotoxina I presenta toxicidad contra células de mamíferos y es muy persistente en el ambiente y ha sido excluida del uso público por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1999); sin embargo, se han utilizado preparaciones de β -exotoxina para el control de larvas de moscas cuando estas presentan resistencia a insecticidas químicos en dosis que no afecten vertebrados (Carlberg *et al.* 1985; Carlberg, 1986).

Inicialmente se determinaba la presencia de β -exotoxina por medio de ensayos biológicos con moscas, pero en la actualidad se utiliza la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) para su detección y cuantificación (Campbell *et al.*, 1987; Hernández *et al.*, 2001; Levinson *et al.*, 1990).

Proteínas Cyt.

Las proteínas Cyt son tóxicas para miembros del orden Díptera (Schnepf *et al.*, 1998). Esta toxina forma canales selectivos para cationes y hay evidencia de que las toxinas Cyt1A se agregan sobre de la membrana ya que se ha identificado que las hélices A y C parecen estar envueltas en el ensamble intermolecular e interacción con la membrana (Butko, 2003). Se ha estudiado la interacción de Cyt1A con los lípidos de membrana,

observando hidrofobicidad de superficie dependiente del pH debido a la pérdida de la estructura terciaria de la proteína lo que genera una interacción de tipo electrostático, y seguramente este proceso es coadyuvado por fuerzas de Van Der Waals y fuerzas hidrofóbicas; Cyt1A se absorbe en la superficie de la membrana causando grandes, y no específicos, defectos en el empaquetamiento celular (Butko, 2003). Recientemente se estudió el efecto del pH y de fuerza iónica sobre la conformación de Cyt1A (Butko, 2003) donde se concluyó que un bajo pH incrementa la superficie de hidrofobicidad, promoviendo la interacción con los lípidos de membrana y agregación no específica, la unión a los lípidos induce la conformación de Cyt1A de una forma similar a esfera deshecha. Las sales neutras tales como cloruro de sodio y de potasio (NaCl y KCl) inducen cambios conformacionales en Cyt1A debido a interacciones específicas con aminoácidos cargados en la superficie de la toxina (Manceva *et al.*, 2004). Esta evidencia lleva a postular la formación de poro, o una perturbación como un detergente de los lípidos de membrana, donde los 2 modelos no son mutuamente excluyentes y quizás podrían operar según diferentes concentraciones de toxina o escalas de tiempo (Butko, 2003).

La clasificación según Bravo (2001) menciona que las toxinas Cry I eran las que presentaban actividad contra insectos lepidópteros, las toxinas Cry II eran proteínas más pequeñas de 70 kDa, activadas contra lepidópteros y dípteros, las toxinas Cry III eran proteínas activas contra insectos coleópteros; las toxinas Cry IV activas contra insectos dípteros y las Cry V y Cry VI activas hacia nematodos, en donde el Cry VI era un grupo que no tenía homología con el grupo Cry V. Sin embargo, muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes, pero con especificidad diferente ó toxinas Cry con actividad dual hacia lepidópteros y coleópteros, que también llamaron Cry V, creando una gran confusión en la nomenclatura. Esto hizo que se creara una nueva nomenclatura de las δ -endotoxinas basadas exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria (Crickmore, *et al.*, 1998). En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábigos. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de *B. thuringiensis* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos ó cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry (Bravo, 2001)

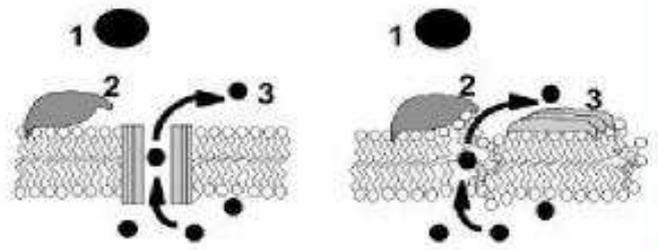


Figura. 2. Mecanismo de acción de la toxina Cyt a la derecha se encuentra el modelo de formación de poros donde la bicapa lipídica no es afectada. En la izquierda se representa la interacción entre la toxina y la bicapa lipídica de la membrana celular a manera de detergente. 1) Toxina soluble en la fase extracelular. 2) Interacción de la toxina con la bicapa lipídica donde cambia su conformación. 3) La toxina induce la formación de poros o la disrupción de la membrana, liberándose el contenido intracelular (puntos negros) (Butko, 2003).

Otras toxinas.

Se han identificado proteínas insecticidas expresadas durante la fase vegetativa de crecimiento de *B. thuringiensis* (VIPs). Estas VIPs no forman inclusiones paraesporales (Schnepf *et al.*, 1998). Las VIPs presentan un amplio espectro insecticida, incluyendo una amplia actividad contra plagas de lepidópteros y coleópteros (Estruch *et al.*, 1996; Estruch y Yu, 2001; Warren, 1997; Yu *et al.*, 1997). Estas proteínas no presentan homología de secuencia con las δ -endotoxinas (Estruch *et al.*, 1996). Las VIPs son una opción importante en cuanto al manejo de resistencia en insectos (Lee *et al.*, 2003). Aun no se conoce la ubicación exacta de los genes que codifican para VIPs, pero no sería sorprendente encontrarlos en los mismos plásmidos de los genes *Cry* (Schnepf *et al.*, 1998). Recientemente se ha propuesto una nomenclatura para estas toxinas (Crickmore *et al.*, 2005).

Patología de *Bacillus thuringiensis*.

Muchos grupos taxonómicos de invertebrados son susceptibles a la acción tóxica de *B. thuringiensis*. Dentro de Lepidópteros, encontramos especies susceptibles en la mayor parte de sus familias, destacando por su interés agronómico a Cossidae, Gelechiidae, Lymantriidae, Noctuidae, Pieridae, Pyralidae, Tortricidae (Navon, 1993). En Díptera, el espectro de actividad del cristal es menor, afectando, entre otras, a especies de Culicidae, Simuliidae y Tipulidae (Krieg, y Langenbruch, 1981), mientras que en Coleóptera se reduce principalmente a Chrysomelidae, Curculionidae, Tenebrionidae y Scarabeidae

(Iriarte y Caballero, 2001). También hay cepas de *B. thuringiensis* que producen cristales tóxicos para especies pertenecientes a los órdenes Himenóptera, Hemíptera y Neuróptera de la clase Insecta (Iriarte y Caballero, 2001).

Cuadro. 1. Clasificación de las cepas de *Bacillus thuringiensis*. De acuerdo a sus proteínas según Höfte y Whiteley (1989).

Cepas	Patotipo	Peso molecular kDa	Tipo de cristal
Cry I	Lepidóptera	130-140	bipiramidal
Cry II	Lepidóptera/Díptera	65	Cúbico
Cry III	Coleóptera	73	Plano
Cry IV	Díptera	135, 128, 65	semiesférico/esférico
Cry V	Lepidóptera/Coleóptera	81	Críptico
Cyt	Inespecífico	27	Redondo/poliédrico

Cuadro tomado de. Iriarte, J. y Caballero, P. 2001. Biología y Ecología de *Bacillus thuringiensis*. In: Caballero, P., Ferre J. (Eds.), Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* En el Control Integrado de Plagas. PHITOMA-España, Navarra, España, pp. 15-44.

Genética y biología molecular de *Bacillus thuringiensis*.

El genoma de *B. thuringiensis* tiene un tamaño que oscila entre 2.4 a 5.7 millones de pares de bases (pb) (Carlson, *et al.* 1994). El mapa físico ha sido construido para 2 cepas de *B. thuringiensis* (Carlson y Kolsto, 1993; Carlson *et al.*, 1996). La comparación con mapas cromosómicos de *B. cereus* sugiere que el cromosoma de *B. thuringiensis* tiene una organización similar en el extremo cercano al origen de replicación, y una gran variabilidad en el extremo terminal (Carlson *et al.*, 1996). Se han encontrado secuencias homólogas a los genes Cry localizadas en el cromosoma de *B. thuringiensis*, y en algunas cepas las mismas secuencias están tanto en el cromosoma como en los plásmidos (Carlson y Kolsto, 1993). No es claro hasta qué punto inciden estos genes cromosomales en la producción del cristal (Schnepf *et al.*, 1998).

Existe una rica diversidad en el genoma de *B. thuringiensis* que le permite al microorganismo subsistir en los ambientes que habita, y varios de estos genes tienen un gran potencial para la producción de cepas con mayor potencia insecticida, con nuevas actividades biológicas y más seguras para el uso comercial o para la producción de organismos genéticamente modificados (OGM).

Dentro de algunos de los genes que codifican para varios fenotipos en *B. thuringiensis*, se han aislado genes que codifican para quitinazas activas contra las fibras de

quitina de la membrana peritrófica del intestino medio de insectos (Barboza-Corona *et al.*, 2003). Un gen *nprA* que codifica para una proteasa neutral A y su ausencia en *B. thuringiensis* incrementa la producción de las proteínas Cry1Bb y Cry3Bb (Donovan y Slaney, 1997).

Hay un gran número de genes de *B. thuringiensis* que codifican para factores de virulencia potenciales que son regulados por un activador transcripcional pleiotrófico llamado *PlcR*, el cual se une a la secuencia palindrómica TATGNAN₄TNCATA (Agaisse *et al.*, 1999; Lereclus *et al.*, 1996).

B. thuringiensis posee un gen homólogo a *aiiA*, responsable de la codificación de una enzima degradadora de la N-acyl homoserina lactona (AHLs), capaz de controlar microorganismos patógenos de plantas que usan AHLs para regular la expresión de diversos fenotipos (quórum sensing) tales como bioluminiscencia, producción de antibiótico y síntesis de factores de virulencia (Lee *et al.*, 2002).

Diferentes genes *clpP*, que codifican proteasas dependientes de ATP, controlan las respuestas específicas adaptativas en *B. thuringiensis*. El gen *clpP1* está envuelto en la tolerancia a concentraciones de sal y baja temperatura, el gen *clpP2* por su parte tiene funciones en la esporulación y motilidad del microorganismo y el gen *clpC* está involucrado en la esporulación. *ClpP1* tiene un papel importante en la virulencia, en la división celular y tolerancia a bajas temperaturas (Fedhila *et al.*, 2002).

Se ha especulado acerca del potencial patogénico de *B. thuringiensis* hacia humanos encontrándose recientemente que la actividad del gen *flhA* es crucial para el ensamble del filamento flagelar, motilidad en medio líquido, previendo y exportando de proteínas flagelares como no flagelares tales como flagelina y proteínas asociadas a virulencia, hemolisina BL (HBL) y la fosfolipasa C afín a la fosfatidilcolina (PC-PLC) lo que podría ser explotado para producir productos a base de *B. thuringiensis* inocuos para la salud humana (Ghelardi *et al.*, 2002).

Hace poco se caracterizó los genes *yqgB* y *yqfZ* que codifican para factores adaptativos los cuales actúan sinérgicamente permitiendo a la bacteria acomodarse al medioambiente in vivo, facilitando la colonización del hospedero (Fedhila *et al.*, 2004).

El producto del gen p20 es una proteína accesoria en *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* necesaria para la expresión de Cyt1A, Cry4A, Cry11A y Cry1C. Además parece influir en el tiempo de esporulación (retrasándola) y en la forma de la spora. Aparentemente P20 es una chaperona molecular (Shao, Z. *et al.*, 2001). La proteína P19 parece tener similares propiedades (Manasherob *et al.*, 2001).

Plásmidos de *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis contiene varios plásmidos (2 a 12 dependiendo de la cepa) cuyos tamaños varían entre 2 a más de 200 kilobases (kb) (1.5 a 150 MDa). Los genes Cry se encuentran en plásmidos de gran tamaño (>40 kb) (Bravo, *et al.*, 2004; 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 ínterespecie. 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, *et al.*, 2004). Recientemente se ha secuenciado en su totalidad el plásmido codificante para toxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (pBtoxis).

Los remanentes de vestigios de genes de toxinas en el plásmido pBtoxis se encontraron secuencias cortas que codifican para fragmentos de toxinas. Las secuencias pBt025 y pBt026 codifican 2 segmentos con homologías a la región central de la toxina Cry28Aa, además parece que pBt053 tiene cierta homología al extremo C terminal de Cry26Aa. La secuencia de aminoácidos codificada por pBt055 es similar al C terminal para proteínas codificadas corriente arriba de los genes de toxinas (una hipotética proteína de 29.1 kDa en la región 5' de cry2Aa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* donde el extremo N terminal es parecido al de Cry11Bb). Estos aparentes remanentes sugieren que durante la evolución de pBtoxis, sus ancestros han sido hospederos de otras toxinas ahora perdidas.

Esto, además de similitudes con transposones y secuencias de inserción, sugiere que la composición de la toxina es un factor dinámico y puede explicar la gran diversidad en la estructura de las toxinas observada en los aislamientos de *B. thuringiensis* (Bravo, *et al.*, 2004; Cerón, 2004).

Evaluación del efecto insecticida de *Bacillus thuringiensis*.

El efecto de *B. thuringiensis* sobre los insectos puede ser medido cuantitativamente por medio de bioensayos, en laboratorio o en campo, el objetivo fundamental de un bioensayo con *B. thuringiensis* es estimar la CL₅₀ (concentración letal media) que es la concentración que mata al 50% de los insectos probados en el bioensayo, además de la determinación de la efectividad de un producto formulado a base de *B. thuringiensis*, medido en función del número de insectos, o del rendimiento del cultivo, al compararlo con productos que se les conozca actividad y compararlo con un testigo (Ibarra y Del Rincón-Castro, 2001).

Teoría del bioensayo.

El término ensayo biológico se refiere a la medición del efecto que ejerce un determinado estímulo sobre una población de organismos. Para *B. thuringiensis* se mide la potencia del agente activo sobre un estado específico del organismo potencialmente susceptible para lo cual se aplica una metodología que permite evaluar la actividad tóxica de una cepa, producto activo u organismo recombinante sin que los resultados se vean afectados por las variaciones propias de los sistemas biológicos (Martínez, *et al.*, 2004). No se ha aprobado una estandarización internacional debido a factores variables como la cepa del insecto por lo que cada laboratorio estandariza sus propias metodologías. Se han recomendado varios protocolos ya que constantemente se descubren nuevas proteínas susceptibles de ser manipuladas para escalamiento de nuevas formulaciones y en la ingeniería del DNA recombinante, procesos que involucran diversos ensayos analíticos (Navon, 2000).

La metodología del bioensayo se basa en tomar a los organismos vivos como aparatos de medición, y establece el parámetro biológico que utilizará (mortalidad,

longevidad, fertilidad, crecimiento, atracción, etc.) para relacionar el factor causal con el efecto sobre el organismo. Además los bioensayos con *B. thuringiensis* persiguen algunos otros objetivos como lo son:

1).- Determinar la eficiencia relativa de una cepa nueva, transformada o un producto de fermentación o cristales puros, sobre una población de insectos.

2).- Determinar la susceptibilidad de diferentes razas o especies de insectos a una cepa estándar de *B. thuringiensis*.

3).- Cuantificar la actividad de productos obtenidos de fermentaciones como método de estandarización de productos comerciales (De León-Hernández, 1994; Ibarra y Del Rincón-Castro, 2001).

El bioensayo se basa en la hipótesis farmacológica, la cual establece que un individuo manifestara el efecto medido al administrarle una dosis determinada del fármaco en prueba, la cual varía de un individuo a otro. Y el efecto sobre una población de individuos mostrara límites mínimos y máximos de dosificación; esto implica probar varias dosis sobre una población de individuos respectivamente, con el fin de establecer una relación entre las dosis probadas y la mortalidad que causa. (En nuestro caso las preparaciones de *B. thuringiensis*), de tal forma que refleje datos reales de la toxicidad; de tal manera que los datos puedan ser analizados estadísticamente y poder estimar un parámetro estadístico que represente, con un nivel de probabilidad dado, la toxicidad de la preparación en prueba (Ibarra y Del Rincón-Castro, 2001).

Parámetros Estadísticos del Análisis Probit.

De acuerdo con lo establecido por Ibarra y Del Rincón Castro (2001), los principales parámetros del análisis Probit para estimar la concentración letal media son: el valor de ji-cuadrado (X^2) y la pendiente de la recta de regresión. Que para poder determinar la CL_{50} es necesario conocer la dosis que teóricamente mata al 50% de población bajo ensayo. Sin embargo, una dosis representa una determinada cantidad del elemento tóxico que es administrado a cada uno de los individuos. Comúnmente los individuos se exponen a concentraciones desconociendo la cantidad precisa que ingiere cada individuo. Es por eso

que en las pruebas con *B. thuringiensis* normalmente se estiman la Concentración Letal Media (CL₅₀).

Requerimientos estadísticos de los bioensayos con *Bacillus thuringiensis* para el análisis Probit.

Existen diversos requerimientos que deben ser cubiertos por los bioensayos con *B. thuringiensis*:

- a) La mortalidad natural en los individuos testigo debe ser igual o menor al 10 %
- b) El valor de la X^2 (ji-cuadrada), en un bioensayo de 6 dosis, debe ser menor o igual a 5;
- c) De una serie de 6 dosis probadas, el valor de la CL₅₀ estimada debe estar contenido entre la segunda y la cuarta dosis;
- d) Por lo menos 4 de un total de 6 dosis probadas deben causar una mortalidad entre 10 y 90%;
- e) El valor de la pendiente de la línea de regresión debe ser de 1.5 a 6;
- f) El cociente entre el límite fiducial mayor y el menor (P= 0.95) debe ser menor o igual a 2;
- g) Deben realizarse por lo menos 3 repeticiones válidas, por separado; y
- h) El coeficiente de variación (CV) de la CL₅₀ media (estimada a partir de las repeticiones) debe ser igualo menor al 20% (Ibarra y Federici, 1987).

Factores que influyen sobre el bioensayo.

Aunque que los organismos de prueba sean de la misma especie, edad, entre otros factores, siempre hay que estandarizar de las condiciones de bioensayo para ello se deben considerar las siguientes variantes:

- a) Modo de suministro del material tóxico y su provisión,

- b) La edad del insecto sobre el que se prueba el material tóxico,
- c) La técnica para integrar el material tóxico si se suministra sobre una dieta natural o artificial,
- d) El número de insectos utilizados por repetición y el número de dosis probadas.
- e) El tiempo de exposición, factores físicos ambientales (temperatura, humedad, fotoperiodo); entre otros (Ibarra y Del Rincón-Castro, 2001).

MATERIALES Y METODOS.

Ubicación del área de estudio.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioinsecticidas, del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. (CINVESTAV-IPN) Ubicado en el Km. 9.6 del Libramiento Norte carretera Irapuato-León, Apartado Postal 629, 36500 Irapuato, Guanajuato, México.

Cepas de estudio.

Para el presente estudio se utilizaron cepas de *B. thuringiensis* de la colección del Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-IPN, Irapuato, Gto. México. Se utilizaron quince cepas atípicas de *B. thuringiensis* (Cuadro. 2), aisladas de muestras de suelo en el Estado de Guanajuato y mantenidas en el cepario de entomopatogenos del mismo laboratorio. Las cepas estaban almacenadas a -20°C y para su activación fueron sembradas en agar para métodos estándar e incubadas a 28°C durante 24 a 48 hrs.

Cuadro. 2. Descripción de cepas atípicas de *Bacillus thuringiensis* del Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-Irapuato utilizadas en este estudio.

Cepas*	Genes con menos del 50 %**	Genes con 50 a 75 %**	Tipo de cristal
LBIT-113	SI		Cuadrado
LBIT-597	SI		ND
LBIT-824	SI		Semiesférico
LBIT-935		SI	ND
LBIT-937		SI	ND
LBIT-953	SI	SI	ND
LBIT-955	SI	SI	Bipiramidal
LBIT-956	SI		Esférico
LBIT-976		SI	Esférico
LBIT-979	SI		ND
LBIT-980	SI		Semiesférico
LBIT-985	SI	SI	ND
LBIT-1003		SI	Esférico
LBIT-1004		SI	Esférico
LBIT-1189		SI	Bipiramidal

* Código del Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-IPN. Irapuato.

** Porcentaje de identidad de genes (estudios en CINVESTAV-IPN. Irapuato).

ND: no determinado.

Cultivo y purificación de cristales de *Bacillus thuringiensis*.

Las cepas se cultivaron en medio líquido de leche peptonizada (MLP) (10 g leche peptonizada, 7 g dextrosa, 2 g extracto levadura, 0,3 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg mL^{-1} $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg mL^{-1} $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,020 mg mL^{-1} $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ en un volumen final de un litro, y ajustado el pH a 7.5) en matraces de 200 ml, con un volumen de 50 ml de MLP, con agitación constante de 300 rpm a 28°C, hasta su completa autólisis (de 4 a 6 días). En seguida se colectó por centrifugación el producto de la fermentación con el fin de eliminar exotoxinas excretadas y desechos celulares. Para ello se utilizó una ultracentrífuga (Bekman) a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C, y se lavó tres veces con agua destilada estéril, eliminándose el sobrenadante y resuspendiendo en cada oportunidad. Finalmente, el complejo espóra-cristal se congeló a -80°C para luego ser liofilizado y almacenado a 4°C, hasta su utilización.

Con la finalidad de obtener el complejo espóra-cristal se retiró de los matraces el medio de cultivo con las cepas de *B. thuringiensis* de la incubadora y se procedió a lavar el complejo espóra-cristal en tubos falcón con capacidad de 50 ml, como se mencionó anteriormente. Para centrifugar se calibraron (equilibraron los pesos) los tubos en una balanza granataria agregando si era necesario agua desionizada estéril con ayuda de una pipeta Pasteur. Una vez calibrados los tubos se colocaron en el rotor y se procedió a centrifugarlos.

Al término del proceso se obtuvo una pastilla intacta con la mínima cantidad de líquido posible. En el mismo tubo se dejaron las muestras con el mínimo de humedad posible y se congelaron las pastillas a una temperatura de -20 a -70 °C y después se liofilizaron (extracción de toda la humedad de las muestras). Una vez congeladas las muestras se taparon los tubos con Parafilm al cual se le realizaron pequeños orificios de tal manera que estos fueran conductos de extracción de la humedad. Posteriormente, los tubos con las muestras se colocaron en un frasco Labconco para su posterior liofilización. Las muestras se liofilizaron en condiciones de vacío, hasta que se extrajo toda la humedad de las mismas, y posteriormente se refrigeraron hasta ser requeridas.

Mantenimiento de las colonias de insectos para la evaluación tóxica de *Bacillus thuringiensis*.

Las colonias de insectos se mantuvieron bajo condiciones de insectario a 28°C, con un fotoperiodo de 12:12 h. (luz: oscuridad) y una humedad relativa de 80%, a las cuales se les suministró dieta artificial y natural en algunos casos.

Mantenimiento de la colonia de *Manduca sexta*.

Para obtener el material biológico que se utilizó como sujetos de prueba en el presente trabajo, (larvas de primer instar de *Manduca sexta*) fue necesario mantener una colonia que contemplase insectos a distintos estados larvarios, así como adultos, con el único fin de obtener dicho material continuamente. Por lo tanto, en primera instancia se obtuvieron huevecillos de *Manduca sexta* de los adultos existentes del insectario del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Campus Guanajuato. Éstos se colocaron en una caja Petri y se prosiguió a incubarlos en una cámara de crecimiento especial localizada en el mismo insectario bajo condiciones controladas de temperatura (28°C) y humedad relativa (60%) por un periodo estimado de 2 a 3 días, vigilando constantemente su desarrollo. Una vez que eclosionaron las larvas de los huevecillos se procedió a cambiarlas a una placa con dieta especialmente elaborada, la cual contiene todos los nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo de estas. Con ayuda de unas pinzas, se tomaron las larvas por el cuerno con la finalidad de no lastimarlas. Se colocó un máximo de 30 larvas por placa, las cuales se incubaron en la cámara de crecimiento a las mismas condiciones (28°C y 60% de humedad). En dado caso que no se pudiese vigilar el desarrollo de los embriones, se depositan los huevecillos en cajas Petri con 3 divisiones; en dos de ellas se coloca la dieta para *Manduca sexta*, y en la tercera división se colocan los huevecillos, y se almacenan en la cámara de crecimiento con la finalidad de que una vez emergidas las larvas, éstas se alimenten de la dieta colocada en las otras dos divisiones de la caja Petri. Con esto evitar que dichas larvas perezcan debido a la falta de alimento (si las larvas no obtienen alimento a un máximo de 4 horas de haber eclosionado, éstas tienden a perecer por el colapso del intestino). Posteriormente las larvas se cambiaron a placas de dieta, y conforme se iban desarrollando, se aislaron hasta separarlas individualmente en sus respectivas cajas.

Al pasar al segundo o tercer estado larvario, las larvas se colocaron en otras cajas Petri a las cuales se les colocó un pedazo de dieta, posteriormente se colocaron las cajas en columnas de seis, sobre una charola y llevaron al cuarto de crecimiento (de 1 a 2 larvas por caja). Sólo se cambiaron de caja si éstas se encontraban demasiado sucias o la larva era demasiado grande, de lo contrario sólo se agregaba la dieta correspondiente a la misma caja.

En cuanto las larvas alcanzaron el estado de prepupa, es decir; que se les notara a simple vista el corazón, se preparó una charola de plástico a la cual se le agregó Vermiculita húmeda. Las larvas se lavaron con agua potable para retirar cualquier posible contaminante físico y posteriormente se colocaron en las charolas, colocando un máximo de 15 prepupas por charola, las cuales se etiquetaron con las fechas en las que fueron colocadas inicialmente y la fecha próxima a ser emergidas como adultos (lo cual se estima en un periodo aproximado de 20 días). Dichas charolas se colocaron en el mismo cuarto de crecimiento. Transcurrido el lapso de tiempo se colocaron las pupas en las jaulas y se esperó que completaran su metamorfosis. Una vez formados los adultos (emergida la mariposa), estos se transfirieron a una jaula más amplia en donde sólo se encontraban los adultos y se les alimentó con solución de miel al 20%, la cual se les colocó en tubo que en la parte superior tenían una flor de plástico; para engañar a los insectos y que de esta manera se alimentaran de la solución. Diariamente se les cambiaba la solución de miel, debido a que esta se fermenta fácilmente por las bacterias presentes, por lo que se trató de evitar la proliferación de agentes patógenos.

Transcurrido un lapso de tiempo (aproximadamente 2 días) después de que emergieron los adultos como tal y comenzaron a copular se les colocó una planta de tabaquillo (*Nicotiana glauca*), con la finalidad que ovopositaran en ella. Una vez que ovopositaron se les retiró la planta de tabaquillo y se reemplazó por una nueva o se reutilizó en algunos casos, y solamente se enjuagaba con agua potable. Después se retiraron los huevecillos de la planta y se pesaron en una caja petri, para estimar el número aproximado de huevecillos tomando como referencia que 472 huevecillos pesan 0.6198 gramos. Los primeros huevecillos obtenidos se colocaron en las cámaras de crecimiento para su crianza. Mientras que el material obtenido que no se utilizó se refrigeró (12°C) por un periodo no

mayor a 5 días; con la finalidad de obtener material a distintos días en un periodo corto de tiempo. Y cuando fueron requeridas se colocaron los huevecillos a temperatura ambiente y después a la cámara de crecimiento y se repite el ciclo nuevamente.

Mantenimiento de la colonia de *Aedes aegypti*.

Con el propósito de obtener los sujetos de prueba para realizar los bioensayos correspondientes, se obtuvieron huevecillos de *Aedes aegypti* procedentes de la colonia existente del insectario del CINVESTAV Campus Guanajuato. Este material biológico se encontraba en tiras de papel estraza depositadas en sobres que a su vez se encontraban en bolsas herméticas. Para la eclosión de los huevecillos, en una jarra se colocó 1 litro de agua de garrafón caliente la cual se colocó en un horno de microondas por un periodo de 20 minutos. Al término de este lapso de tiempo se tapó la jarra con papel aluminio y se colocó en un recipiente que contenía hielo, con la finalidad de enfriar lo más rápido posible el agua a utilizar, cuidando con un termómetro que sólo se bajara la temperatura a las condiciones ambientales (24°C), de lo contrario se podría afectar el procedimiento matando a los embriones debido a las disminuciones drástica de temperatura. El agua una vez a temperatura ambiente se colocó en pequeñas charolas de plástico y posteriormente se cortó la tira de papel en donde se encontraban los huevecillos en pequeñas tiras, cuidando de no lastimarlos. Estas tiras de papel con ayuda de unas pinzas se colocaron en las charolas con agua de manera que las tiras permanecieran en la superficie del agua y los huevecillos quedaran dentro de esta misma. Con ayuda de un desecador de plástico y una bomba de vacío se obligo a las larvas a emerger de los huevecillos, es decir, las charolas se colocaron dentro de un desecador y se conecto la bomba de succión por un periodo aproximado de 20 minutos, la cual ayudo a extraer todo el oxígeno disponible dentro del desecador, lo que estimulo a las larvas a emerger de los huevecillos. Una vez transcurrido el tiempo estimado se desconecto la bomba y se cerró la válvula del desecador, se dejó entrar el aire lentamente para evitar que los huevecillos implotaran por el cambio de presión.

Una vez emergidas las larvas, se extrajeron las charolas del desecador y se colocaron las tiras de papel en otras charolas para que las larvas que todavía no emergían lo realizaran en las charolas y con la misma agua para no saturarlas con demasiados individuos de prueba. A estas charolas se les colocó alimento y se incubaron en la cámara

de crecimiento correspondiente a condiciones controladas de temperatura (28°C) y humedad relativa (60%). Se les colocó nuevamente alimento a las 24 horas, conforme a su desarrollo se colocaron en platos más amplios con agua potable almacenada en vasos de precipitados de 2 litros y sellados con papel aluminio en la cámara de crecimiento correspondiente a la colonia de *Aedes aegypti*, para su mejor desarrollo.

Una vez transcurrido su estado larvario se comienzan a formar las pupas, las cuales se separaron con ayuda de una pipeta plástica y se depositaron en charolas con agua potable dentro de una jaula con la finalidad de que terminaran su metamorfosis y que emergieran los adultos. Es decir, el mosquito como tal, con la finalidad de formar una colonia de adultos. Estos mosquitos se alimentados con solución de sacarosa al 10% la cual se les suministro mediante pedazos de algodón empapados con dicha solución colocándolos en platillos dentro de la jaula, para alimentar a las larvas se les suministro croqueta molida finamente. Con la finalidad de obtener más huevecillos se colocó una charola plástica blanca recortada que contenía agua potable y se les colocó una tira de papel estraza alrededor con el objeto de que las hembras ovopositaran en esta tira. Las hembras para ovopositar además de la solución de azúcar y copular necesitaron otros nutrientes que sólo obtuvieron de la sangre de mamíferos, por lo que se les introdujo un hámster en una maya metálica para inmovilizarlo por un periodo de 15 minutos en oscuridad total, procurando no lastimar al roedor y retirándolo inmediatamente de haberse cumplido el tiempo establecido. Posteriormente de haber obtenido los huevecillos, se extrajeron las charolas y las tiras de papel se secaron almacenándolas en sobres de papel las cuales se etiquetaron con el mes y día correspondiente, después se depositaron en bolsas herméticas para almacenarlas hasta ser requeridas nuevamente, con lo que se repite el mismo procedimiento.

Mantenimiento de la colonia de *Leptinotarsa texana*.

Con el fin de obtener los sujetos de prueba para realizar los bioensayos correspondientes, se obtuvieron huevecillos de *Leptinotarsa texana* procedentes de la colonia existente del insectario del CINVESTAV Campus Guanajuato. Las condiciones de mantenimiento fueron una temperatura de 28 °C y 75% de Hr. con fotoperiodo de 8:16 horas de oscuridad: luz. Este material biológico se colocó en cajas de plástico con tapas que permiten la entrada de oxígeno, (tipo galletera), de la cual se colectaron huevecillos en

cajas Petri, para colocarlos en la cámara de crecimiento, para conseguir la eclosión, los cuales se sustrajeron con un pincel No. 2 de cerda suave, previamente humedecido, ya que el huevo quedo adherido fuertemente sobre las paredes de la caja. Posteriormente de la eclosión de huevecillos se prosiguió a pasar las larvas de primer instar en vasos de plástico de 25 ml, con dieta natural a base de “Trompillo” triturado (*Solanum elaeagnifolium*). Después de alcanzar el tercer o cuarto instar las larvas se transfirieron a las cajas antes mencionadas en las cuales se les coloco hojas de “Trompillo” previamente lavado con agua clorada para eliminar algún contaminante patógeno. Posterior a esto, las prepupas se cambiaron a una charola con vermiculita húmeda, lugar donde pupan y allí es donde completan su desarrollo al llegar al estado adulto, dentro de la cámara de crecimiento, y así continuar el ciclo biológico.

Bioensayos.

La inclusión del producto microbiano en la dieta del insecto puede hacerse de varias formas tales como mezclarlo con el agua de preparación de la dieta, la contaminación superficial de la dieta donde el producto se esparce y se deja secar, el microgoteo que consiste en agregar de 1 a 5 microlitros (μ l) de la muestra a evaluar que puede llevar un atrayente (generalmente sacarosa), la contaminación del alimento natural (hojas, tubérculos o tallos) con la suspensión de la muestra por aspersion, barnizado o inmersión; con dípteros se utiliza mezclar el ingrediente activo con el agua donde se colocaran las larvas, en insectos de instares avanzados se puede inyectar directamente el producto en el tracto digestivo por vía oral (Martínez, *et al.*, 2004).

Bioensayos contra *Manduca sexta*.

Con el objeto de obtener los resultados de manera uniforme y lo más representativamente posible, se utilizó la técnica de plaqueado (extensión en superficie), para lo cual se prepararon placas de dieta artificial (Apéndice A) para *Manduca sexta* en cajas Petri. No fue necesario realizarlo en condiciones asépticas debido a que la dieta cuenta con un antibiótico (tetraciclina) y dos antimicóticos (Metilparaben y formaldehído). La dieta se cortó en pedazos uniformes con una espátula y se depositó en un vaso de precipitados de 500 ml y se le agrego una pequeña fracción de agua (para compensar la

pérdida de humedad en el proceso) y es fundió en un horno de microondas. El tiempo varía de acuerdo a la cantidad de dieta expuesta al proceso, una vez fundida la dieta se vació en cajas Petri, tratando que las placas quedaran totalmente lisas en su superficie para facilitar el plaqueado y procurando que no se formaran burbujas en la superficie lo que podría alterar los resultados de alguna manera. Las placas ya gelificadas y libres de humedad en la tapa, se colocaron sobre un plaqueador y se les agrego alícuotas de 200 μ l de diferentes concentración del complejo espora-cristal de *B. thuringiensis*. Con ayuda de una barrilla metalizada de platino se extendió homogéneamente en toda la superficie de la placa (esterilizando la barrilla entre al término y al inicio de cada plaqueado en distinta caja y enfriándola en etanol al 96%). Una vez difundida toda la suspensión, se dejo secar la placa (las cuales son rotuladas previamente con tratamiento y fecha).

Al término de este proceso las cajas se trasladaron a la campana de extracción, donde se les colocó una rejilla plástica (las cuales son desinfectadas en cloro y expuestas en luz UV por un periodo mínimo de 12 horas) posteriormente se colocó una larva de 24 horas (primer instar) en cada cuadro, colocando un total de 10 larvas por cada caja, después se incubaron en la cámara ambiental por 5 días a 28°C y 60% de humedad relativa, transcurrido este tiempo se tomaron los datos al 5^o día. Cabe señalar que este proceso se realizó tomando en cuenta que cada tratamiento estuvo formado de 20 larvas; es decir, 2 cajas, y también realizando el número de repeticiones que fueron necesarios (tres validas para el análisis Probit).

En resumen el bioensayo hacia *Manduca sexta* consistió en; un bioensayo cualitativo de *B. thuringiensis* sobre larvas de primer instar de *Manduca sexta* (10 μ g/cm²) donde:

- 1) Se pesaron 3 mg del complejo espora-cristal de cada cepa a probar y resuspendieron en 1 ml de Tween (3 mg/ml) (solución madre).
- 2) Se dispersaron 200 μ l de la suspensión anterior de *B. thuringiensis* en una caja Petri con dieta artificial. Esto se repitió para cada cepa que se evaluó según tratamientos y repeticiones.

- 3) Se dejaron secar las cajas, una vez plaqueadas.
- 4) Se colocó una rejilla de separación en cada caja y una larva por compartimiento, utilizando 10 larvas por caja y un total de 20 larvas por tratamiento con sus tres repeticiones correspondientes.
- 5) Los bioensayos se incubaron por 5 días en cámara de crecimiento a 28 °C a 70% de Hr. y se cuantificó la mortalidad.

Los primeros bioensayos que se realizaron fueron “bioensayos burdos” partiendo de la solución Madre de 3 mg/ml, colocando en cada caja plaqueada una concentración final de 10 µg/cm². Esto se repitió para las quince cepas. Posteriormente se continuó con la realización de los bioensayos semifinos, utilizando solo las cepas que causaron del 80 al 100% de mortalidad. Se probaron 4 dosis con un factor de dilución de 0.5; con lo que se logró estimar el rango de concentraciones que se deberían utilizarse para continuar con los bioensayos finos.

Para realizar los bioensayos finos se utilizaron seis dosis (según el rango de concentraciones previamente establecidas) y estos resultados se emplearon para estimar la CL₅₀. Con el objetivo de obtener resultados reproducibles, los bioensayos se repitieron un mínimo de tres veces.

Bioensayos contra *Aedes aegypti*.

Para este trabajo se decidió utilizar larvas de cuarto instar temprano de mosquitos (*Aedes aegypti*) las cuales fueron separadas de la colonia con ayuda de una pipeta plástica y colocadas en un plato metálico con agua potable libre de contaminación alguna. Los tratamientos se prepararon en vasos de plástico se depositaron 100 ml de agua, y con la ayuda de una pipeta plástica y una pequeña red se seleccionaron las larvas de cuarto instar y se colocaron, 20 larvas por tratamiento, tratando de no alterar el volumen de cada vaso. A cada uno de estos recipientes ya con las larvas se les agregó determinada cantidad de las diferentes concentraciones de espora-cristal de cada una de las quince cepas de *B. thuringiensis*. Posteriormente estas concentraciones se mezclaron cuidadosamente en el medio tratando de no dañar a ningún sujeto de prueba (larvas). Después se incubaron en la

cámara ambiental por 24 horas a 28°C y 60% de humedad relativa. Al término de este periodo de exposición se procedo a leer el bioensayo y se tomo nota de los datos arrojados por este mismo.

En resumes los bioensayos contra *Aedes aegypti* constaron en las actividades siguientes;

Bioensayos cualitativos de *B. thuringiensis* sobre larvas de cuarto instar temprano de *Aedes aegypti* (concentración final probada de 10 µg/ml) donde:

- 1) Se pesaron 5 mg del complejo espora-cristal de cada cepa a probar y se resuspendieron en 1 ml de Tween al 0.02% (5 mg/ml).
- 2) Se agregaron 100 ml de agua desclorada en cada vaso de plástico probado para cada cepa analizada, y se agregaron 20 larvas de cuarto instar temprano para cada tratamiento y repetición.
- 3) Se agregaron 200 µl de la suspensión de *B. thuringiensis* a cada vaso.
- 4) El bioensayo se incubo por 24 hs, al término de las cuales se cuantifico la mortalidad.

Los primeros bioensayos que se realizaron fueron “bioensayos burdos” partiendo de la solución Madre de 5 mg/ml, cuya concentración final de prueba fue 10 µg/ml. Esto se repitió para las quince cepas y posteriormente se procedió a realizar los bioensayos semifinos con las cepas que propiciaron del 80 a 100% de mortalidad, empleando 4 dosis con un factor de dilución de 0.5; con lo que se logró estimar el rango de concentraciones que se deberían utilizar para continuar con los bioensayos finos.

Los bioensayos finos se efectuaron con seis dosis (según el comportamiento de los rangos de dosis probadas) y así se obtuvieron los datos para estimar la CL₅₀. Con el objetivo de obtener resultados reproducibles, los bioensayos se repitieron un mínimo de tres veces.

Nuevo método de Bioensayos contra *Aedes aegypti*.

Como el complejo espora-cristal liofilizado que se utilizó para el bioensayo contra *Aedes aegypti*, presentaba grumos y la resuspensión no era totalmente homogénea, se optó por un nuevo método, el cual consistió en cultivar (en MLP) las cepas que ya se habían evaluado anteriormente y que presentaron toxicidad. Se purificaron los cristales como se mencionó anteriormente (ver tema 4. 3.), solo que no se congelaron ni liofilizaron. Cuando se obtuvo la pastilla del último lavado, se agregó una cantidad conocida de agua destilada, posteriormente se recortaron tres círculos de papel secante del mismo tamaño (2 a 2.5 cm de diámetro) y se colocaron en una caja Petri para después meterlos en una incubadora a 30 °C, con el objetivo de que perdieran la humedad. Después de esto se pesaron en una balanza digital y se registraron sus pesos. Enseguida se le colocaron 200 µl de la solución antes preparada y se dejó secar por un periodo de dos a tres horas en la incubadora a 30 °C. El siguiente paso fue pesar nuevamente el papel ya seco y así poder determinar la cantidad de complejo espora-cristal en mg.

Una vez determinada la cantidad de complejo espora-cristal se determinó la concentración en mg/ml y así saber la cantidad que se tendrá que agregar a los tratamientos. Este nuevo método permitió tener datos para determinar la CL₅₀, además de obtener datos con reproducibilidad.

Bioensayos contra *Leptinotarsa texana*.

Para los bioensayos contra *Leptinotarsa texana* se decidió utilizar larvas de tercer instar las cuales fueron obtenidas de la colonia del insectario establecido en el CINVESTAV-Irapuato, se separaron las larvas a utilizar del resto de la colonia ya que estas se dejaron en ayuno por 24hs en compartimentos de cajas de microtitulación de 24 pozos. Transcurridas las 24hs se pesaron cada una de las larvas en balanza digital y se registraron los pesos de cada una según el número de fila y número de pozo, ya que los tratamientos estuvieron formados por 10 larvas.

Para los tratamientos se preparó una solución de complejo espora-cristal en Tween (0.02%) y sacarosa (40%), para después colocar microgotas de la solución en papel

encerado con el objetivo de evitar que se filtrara o absorbiera. Dichas microgotas fueron absorbidas o succionadas por las larvas de *Leptinotarsa texana*. Después de que la larva consumió totalmente la microgota se depositó en el pozo de la caja de microtitulación correspondiente y se le agregó dieta natural de “trompillo” triturado, no dejándolo sin alimento ya que este se incubó por 48hs para pesar nuevamente y así obtener datos para el análisis de toxicidad.

En resume las actividades de los bioensayos contra *Leptinotarsa texana* constaron en las actividades siguientes;

Bioensayos cualitativos de *B. thuringiensis* sobre larvas de tercer instar de *Leptinotarsa texana* (1 µg/larva) donde:

- 1) Se pesó 1mg del complejo espora-cristal de cada cepa a probar y se resuspendieron en 1 ml de Tween 0.02% (1 mg/ml).
- 2) Se seleccionaron 10 larvas de tercer instar por cada cepa de *Bacillus thuringiensis* y se dejó en ayuno por 24 hs en compartimientos de cajas de microtitulación de 24 pozos.
- 3) Se pesaron las larvas después del ayuno.
- 4) Se tomaron 50 µl de la suspensión de *Bacillus thuringiensis* y se mezclaron con 50 µl de sacarosa al 40%.
- 5) Se colocó una microgota de 2 µl de la segunda suspensión (inciso 4) sobre papel encerado y se colocó a cada larva frente de cada gota.
- 6) Se depositaron las larvas que consumieron toda la gota en recipientes con trompillo e incubó por 48 hs.
- 7) Se pesó cada una de las larvas después de la incubación, para obtener datos para el análisis de toxicidad.

Determinación de perfiles proteicos.

Los polipeptidos pueden separarse por peso molecular mediante la utilización de electroforesis en geles de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes, para esto se siguió el protocolo (SDS-PAGE) con ajustes realizados en el laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-Irapuato (De León-Hernández, 1994).

Para la obtención del perfil de proteínas fue necesario cultivar en 5 ml de medio MLP cada una de las cepas para obtener una autólisis homogénea, ya que del liofilizado no se obtuvieron perfiles con bandas claras. En un tubo eppendor se colocó el cultivo y se le dieron tres lavados con agua destilada para después resuspenderlos con un mínimo de agua, posteriormente se tomaron 20 μ l de este complejo espora-cristal y se colocaron en un nuevo tubo eppendor de 10 μ l, a continuación se le agregaron 20 μ l de buffer de carga (Apéndice B) y se calentaron en baño maría a 100 °C por 7 minutos para desnaturalizar las proteínas, además se centrifugó por 30 segundos y se tomó 10 μ l del sobrenadante para cargar el gel y correrlo conectándolo a una fuente de poder, primero a 40 volts por 20 minutos y después a 90 volts por un tiempo de 2 a 3 horas. El gel se preparó con las solución “Gel de separación” (Apéndice C) que se agregó sobre los espacios de entre las placas de la cámara MiniProteam III (Bio-Rad), y una vez polimerizada se colocó la segunda solución “Gel de concentración” (Apéndice D) y se colocaron peines formadores de carriles asta polimerizar y después se retiraron dichos peines, para después cargar la muestra y correr el gel.

Al fin de la electroforesis se extrajeron los geles para teñirlos con el colorante azul de coomasie (Apéndice E) durante una hora en agitación a 50 rpm. Después fue necesario desteñir las partes de gel que no contenían proteínas, mediante la utilización de la solución de destincion (Apéndice F) por un tiempo de 12 horas (toda la noche). Una vez listos los geles, fueron fotografiados para determinar los pesos moleculares de las proteínas comparándolos con un marcador de peso molecular de pesos conocidos. Además los geles fueron colocados entre dos hojas de papel celofán dulce humedecido y se colocaron sobre dos placas de acrílico, la placa superior en forma de marco con el objeto de que el gel no sufrieran daños; estas placas sujetadas con pinzas, después se recortó el entorno del gel para poder conservarlos. Finalmente se analizaron las bandas observando los geles en

transiluminadores de luz blanca y posteriormente se fotografiaron para determinar que efectivamente se trabaja con las proteínas deseadas.

Extracción de plásmidos.

De un cultivo bacteriano de *Bacillus thuringiensis* de 11 a 12 hrs. en 50 ml de medio LB (Apéndice G) se separaron en un volumen y se centrifugó a 13 000 rpm/ 15 min/ 4°C, la pastilla se resuspendió con 10 ml TES frío y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células obtenidas se resuspendieron en 2 ml de sol. De TES-Sacarosa conteniendo 2 mg/ml de lisozima y 1 µl/ml de RNAsa, se incubó a 37°C durante 90 min. Para la formación de esferoplastos (a este tiempo se observan del 50 al 80%) dado el caso se dejó incubar de 1 a 2 hs mas.

A la solución de esferoplastos se adicionó 3 ml de SDS al 8% en TES, se incubó a 68°C durante 15 min. Se adicionó 1.5 ml de solución de Acetato de sodio 3 M pH 4.8, se incubó 30 min. A -20°C, Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm/ 15 min/ 4°C, y el sobrenadante se adicionó dos volúmenes de etanol absoluto y se incubó 30 min. a -70°C, el DNA se recuperó por centrifugación a 13 000 rpm/ 20 min./ 4°C, en este paso la pastilla se resuspendió en 100 µL de TE pH 8.0. Y se visualizó en geles de agarosa al 0.5%.

Determinación de perfil de plásmidos.

Para visualizar el patrón de plásmidos se utilizaron 10 µL de suspensión de DNA, los cuales fueron corridos en geles de agarosa horizontal al 0.5 % (11 cm x 14 cm) de 10 pozos, 1X Tris-borato-EDTA a 2 V/cm, durante 15 y 20 h. Posteriormente fueron teñidos en bromuro de etidio a una concentración de 0.4 µg/ml. Los geles obtenidos fueron fotografiados con un equipo de fotodocumentación Gel Doc. 2000TM Gel system (BioRad Corporation). En cada gel se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (GIBCO, BRL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*.

Como se ha mencionado anteriormente el objetivo de los bioensayos fue estimar la CL_{50} (Concentración Letal Media) basados en la mortalidad, en lo que respecta a, *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*; mientras que para *Leptinotarsa texana* se basó en el efecto inverso de dosis-peso. Los tipos de bioensayo permitieron determinar cualitativa y cuantitativamente la toxicidad de las quince cepas probadas contra estos tipos de insectos de los Ordenes; Lepidóptera, Díptera y Coleóptera. Dichos bioensayos se realizaron utilizando el complejo spora-cristal, lo cual permitió tener concentraciones conocidas de cada una de las cepas. Los resultados muestran que la cepa LBIT-1189 y LBIT-980, presentan toxicidad contra larvas de *Manduca sexta* y *Aedes aegypti* respectivamente, mientras que para *Leptinotarsa texana*, no se encontró toxicidad con alguna de las cepas evaluadas.

Estimación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* contra *Manduca sexta*.

De acuerdo con los resultados obtenidos del Análisis Probit se estimaron los valores de la CL_{50} en $0.309 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta, para la cepa LBIT-1189, que resultó tóxica para el gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*).

Cuadro. 3. Concentraciones utilizadas para estimar la CL_{50} de la cepa LBIT-1189 contra *Manduca sexta*, con respecto al % de mortalidad en los bioensayos.

Concentración LBIT-1189*	% de Mortalidad		
	B1	B2	B3
2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	90	95	95
1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	80	85	80
0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	75	70	75
0.25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	40	40	40
0.125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	15	15	20
0.0625 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	5	5	5

*nomenclatura de CINVESTAV-Irapuato.

B: corresponde al número de bioensayo (con 3 repeticiones por Bioensayo y 20 larvas por repetición).

El cuadro 3 y 4 muestra los parámetros estadísticos del Análisis Probit, para determinar la dosis correspondiente, entre la tercera y cuarta dosis, que se establece tenga efecto en el 50% de la población de individuos probados.

Cuadro. 4. Concentración Letal Media de la cepa LBIT-1189 tóxica para *Manduca sexta*.

Cepa LBIT-1189	Concentración en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ correspondiente a la CL_{50}			
	B1	B2	B3	CL_{50}
Limite Fiducial Inf. CL 50	0.204	0.243	0.226	0.224
CL 50 estimada	0.285*	0.322*	0.321*	0.309**
Limite Fiducial Sup CL 50	0.410	0.448	0.422	0.427

*Valores de la Concentración Letal Media.

** CL_{50} Valida estadísticamente

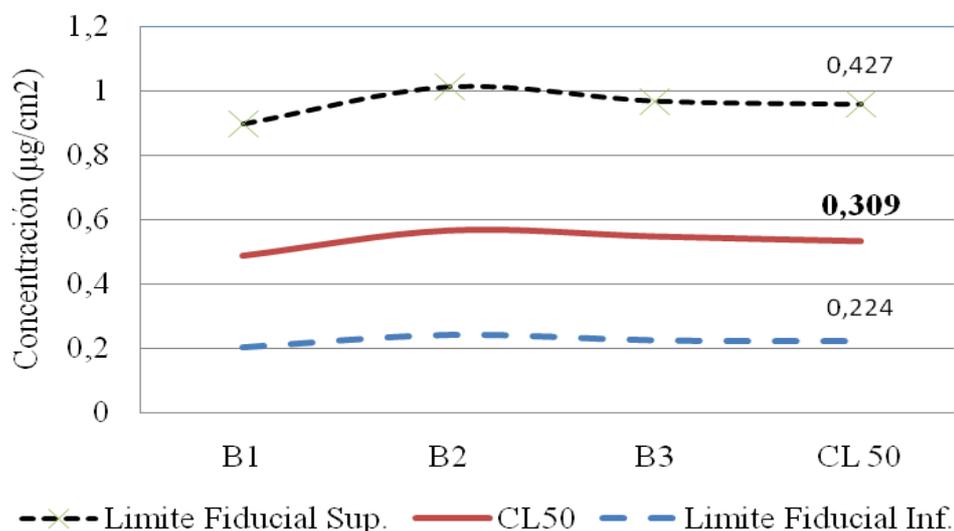


Figura. 3. Límites Fiduciales, Inferior y Superior de la Concentración Letal Media (CL_{50}) de la toxicidad de *B. thuringiensis* contra larvas de primer instar de *Manduca sexta*.

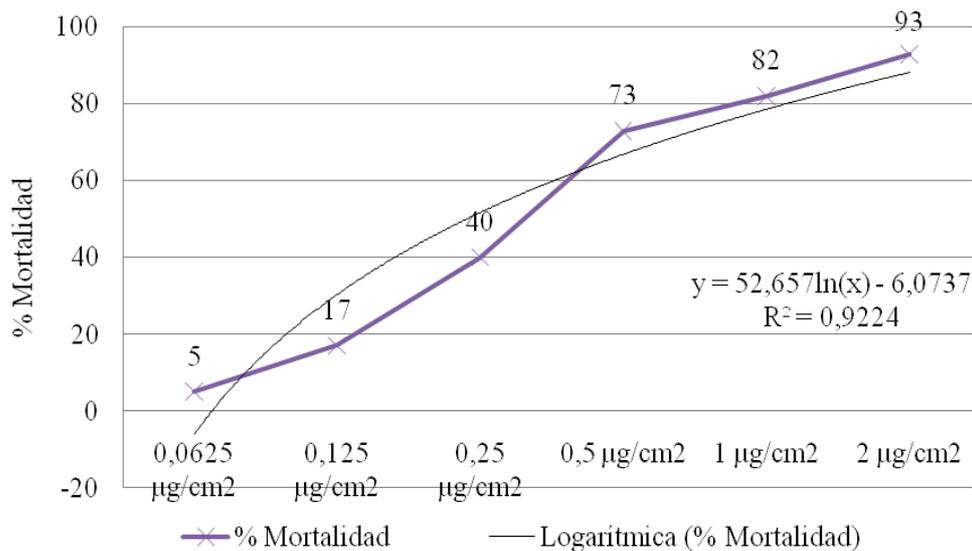


Figura. 4. Relación de la concentración de espora-cristal de *B. thuringiensis* contra la mortalidad causada hacia *Manduca sexta*, (concentración no transformada y transformada a log).

Cuadro. 5. Concentración Letal Media de la cepa LBIT-1189 contra *Manduca sexta*.

Cepa LBIT-1189	Concentración µg/cm²	IP	LFI	LFS	X²	CV	MN%	Pendiente
CL ₅₀	0.309**	60	0.224	0.427	1.189**	9.11**	0%	2.152**
CL ₉₅	1.828**	60	1.001	3.348	1.189**	18.13**	0%	2.152**

** : Parámetros estadísticamente aceptados; IP: individuos probados; Concentración en microgramos/cm² de superficie en dieta; LFI: Limite Fiducial inferior; LFS: Limite Fiducial superior; X²: ji-cuadrada; CV: coeficiente de variación; MN: mortalidad natural.

Los valores estimados de la CL₅₀ en 0.309 µg/cm² son estadísticamente válidos para *Manduca sexta*, en comparación con otras cepas de *B. thuringiensis* tóxicas para el Lepidóptero, *Spodoptera frugiperda* reportadas por Del Rincón-Castro y colaboradores, (2006) utilizando cristales puros, estimaron CL₅₀'s, de 3.367 para LBIT-181, 3.996 para LBIT-193 y 7.636 para la cepa LBIT-27 en µg/cm² de superficie de dieta. Mientras que Gallegos-Morales y colaboradores, (2003) reportaron CL₅₀'s de 48.85, 36.99, 29.28 µg/ml⁻¹ para una cepa de *B. thuringiensis* (Berliner), contra el falso medidor de la col (*Trichoplusia ni*). Se encontró también que Silva-Werneck y Ellar, (2008) estimaron la CL₅₀ para *Manduca sexta*, reportando valores de 6.88 µg/cm² para una proteína Cry9Bb, 0.78 µg/cm² para una Cry9BbA84P y 0.0039 µg/cm² para la Cry1Ac, µg/cm² de dieta artificial) lo cual nos indica

que existen varios grupos de cepas de *B. thuringiensis* que se pueden agrupar como: tóxicas, altamente tóxicas. Como mencionan Del Rincón-Castro y colaboradores, (2006) existen especies de insectos poco susceptibles a las toxinas de *B. thuringiensis* como *Spodoptera frugiperda* en comparación con otras que son altamente susceptibles, como *Manduca sexta*, *Bombix mori* y *Trichoplusia ni*.

Estimación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* contra *Aedes aegypti*.

Los resultados obtenidos de los bioensayos bajo el Análisis Probit permitieron estimar los valores de la CL₅₀ en 5.605 µg/ml, para la cepa LBIT-980, que resultó tóxica para larvas de cuarto instar temprano de *Aedes aegypti* (mosquito transmisor de la fiebre amarilla), los cuales se obtuvieron de los bioensayos resultantes a partir de seis dosis probadas.

Cuadro. 6. Concentraciones utilizadas para estimar la CL₅₀ de la cepa LBIT-980 contra larvas de cuarto instar temprano de *Aedes aegypti*, con respecto al % de mortalidad en los bioensayos.

Concentración LBIT-980*		% de Mortalidad		
		B1	B2	B3
50	µl/ml	90	95	90
25	µl/ml	85	80	80
12.5	µl/ml	65	60	65
6.25	µl/ml	55	55	60
3.125	µl/ml	45	45	40
1.5625	µl/ml	15	15	10

*nomenclatura de CINVESTAV-Irapuato.

B: corresponde al número de bioensayo (con 3 repeticiones por Bioensayo y 20 larvas por repetición).

La CL₅₀ para la cepa LBIT-980 se observa claramente en los cuadros 6 y 7.

Cuadro. 7. Concentración Letal Media (CL₅₀) de la cepa LBIT-980 tóxica hacia *Aedes aegypti*.

Cepa LBIT-980	Concentración en µg/ml correspondiente a la CL ₅₀			
	B1	B2	B3	CL ₅₀
Limite Fiducial Inf. CL 50	3.652	3.846	3.616	3.705
CL 50 estimada	5.527*	5.765*	5.524*	5.605**
Limite Fiducial Sup CL 50	8.366	8.642	8.439	8.482

*Valores de la Concentración Letal Media.

**CL₅₀ Valida estadísticamente

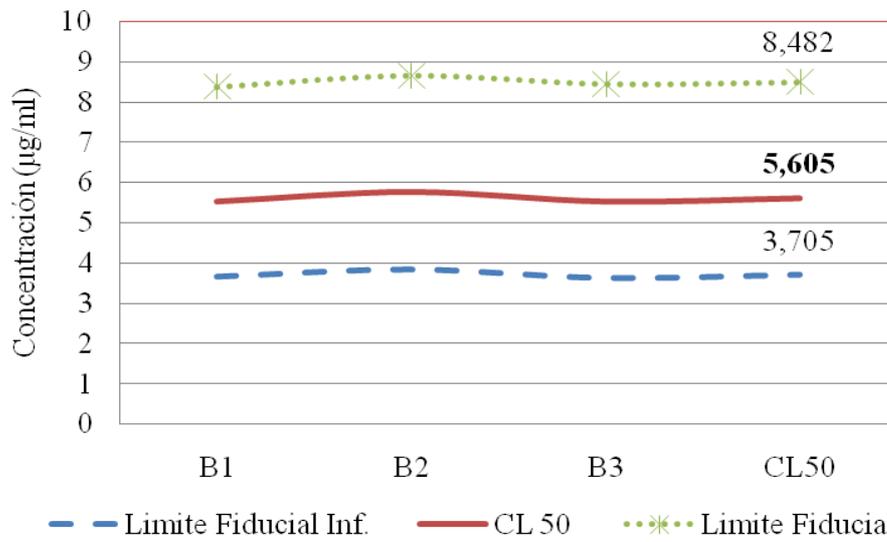


Figura. 5. Límites Fiduciales, Inferior y Superior de la Concentración Letal Media (CL₅₀) de la toxicidad de *B. thuringiensis* contra larvas de cuarto instar temprano de *Aedes aegypti*.

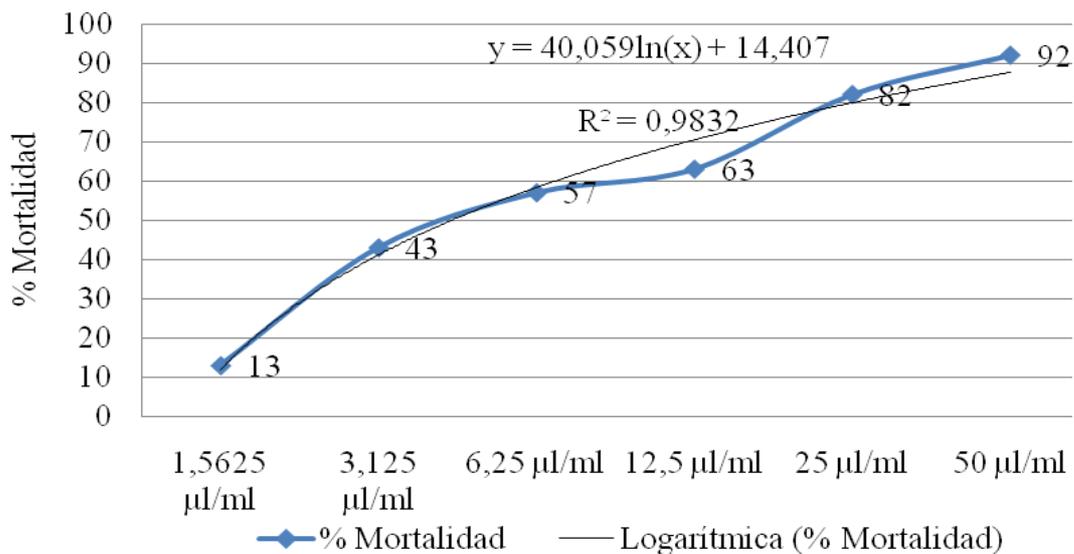


Figura. 6. Relación de la concentración del complejo espora-crista de *B. thuringiensis* con la mortalidad causada en la evaluación tóxica contra *Aedes aegypti*, (concentración no transformada y transformada a log).

Cuadro. 8. Concentración Letal Media de la cepa LBIT-980 tóxica para *Aedes aegypti*.

Cepa	Concentración µg/ml	IP	LFI	LFS	X ²	CV	MN%	Pendiente
CL ₅₀	5.605**	60	3.705	8.482	2.639**	2.47**	0%	1.433**
CL ₅₀	78.910**	60	30.478	204.417	2.639**	4.07**	0%	1.433**

** : Parámetros estadísticamente aceptados; IP: individuos probados; Concentración en microgramos/ml; LFI: Limite Fiducial inferior; LFS: Limite Fiducial superior; X²: ji-cuadrada; CV: coeficiente de variación; MN: mortalidad natural.

Para la estimación de la CL₅₀ fue necesario determinar la cantidad de complejo espora-cristal en base a; la obtención directa de espora-cristal, para esto, se colocaron 200 µl de una solución preparada del complejo en pequeños círculos de papel secante (ver tema de: Nuevo método de bioensayo contra *Aedes aegypti*) y se determinó la cantidad que existía. Con esto se determinó la cantidad exacta que se tendría que aplicar a los tratamientos según las concentraciones evaluadas.

Los resultados de toxicidad hacia *Aedes aegypti* obtenidos del Análisis Probit muestran los valores estimados de la CL₅₀ en 5.605 µg/ml. Como puede observarse estos son estadísticamente válidos para *Aedes aegypti*, y pueden compararse con otras cepas de *B. thuringiensis* tóxicas para algunos Dípteros como, *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*, reportadas por Martínez y colaboradores, (2004) utilizando cristales puros. Ellos estimaron CL₅₀'s, de 6.9 y 1.55 µg/ml para la cepa HU4-2 correspondiente para cada especie, además comparándolas con productos comerciales como Dipel® y Xentari®, que no presentaron efecto alguno, ya que estos productos solo presentaron actividad hacia Lepidópteros como, *Helicoverpa armígera*, *Spodoptera littoralis* y *Spodoptera frugiperda*.

Las aplicaciones de la toxina de *B. thuringiensis* para el control de vectores y plagas de interés agrícola se realizan principalmente en suspensiones de esporas-cristal en agua a los cuales se les pueden agregar estabilizadores, protectores solares y en forma de aerosol y, se hace o muy temprano o muy tarde para evitar la radiación solar y cuando no llueve para evitar su lavado. En el control de las larvas de mosquitos con fórmulas que contienen la cepa de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, el insecticida se pone sobre charcas o medios de proliferación de los mismos.

Los factores antes mencionados dificultan la actividad garantizada de *B. thuringiensis* contra cualquier plaga o vector, por lo que existen alternativas como la transformación de células como la utilizada por Guevara y colaboradores (2004). Ellos transformaron una bacteria acuática que no se sedimenta fácilmente y además que las proteínas se expresan en el citoplasma quedando protegidas de los rayos UV. Dicha bacteria fue transformada con el plásmido pSOD3, el cual contiene el gen que codifica para la proteína Cry11Aa de *B. thuringiensis* serovar *israelensis* y misma que utilizaron para el control de *Aedes aegypti* estimando la CL₅₀ de 104.04 ng/ml, 32.14 ng/ml y 22.96 ng/ml para cultivos de 24, 72 y 96 hs de crecimiento respectivamente, de *Asticcacaulis excentricus* transformada con el plásmido pSOD3. De tal manera que es evidente que es necesario garantizar el efecto insecticida de *B. thuringiensis* sobre el control de insectos ya sea con cepas alta o potencialmente tóxicas o con organismos genéticamente transformados.

Estimación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* contra *Leptinotarsa texana*.

Para poder determinar la toxicidad de *B. thuringiensis* hacia *Leptinotarsa texana* no se estableció una CL₅₀ sino la dosis efectiva media (DE₅₀), ya que ésta se basa en la relación inversa de la dosis contra el peso de las larvas; y así determinar la DE₅₀ a diferencia de las CL₅₀'s estimadas en los bioensayos para *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*. Para estimar este parámetro se utilizaron 10 larvas de *L. texana* de tercer instar temprano y 10 para el testigo.

Para determinar la DE₅₀ se requirió pesar las larvas para la evaluación de cada cepa antes y después de cada tratamiento (como se ha mencionado anteriormente) y con estos valores se calculó la media del peso inicial y el peso final (MPI y MPF), para así determinar el factor de crecimiento (el número de veces que aumentaron su peso las larvas durante el intervalo del bioensayo), el cual fue obtenido al dividir la MPF entre la MPI. Así si el valor correspondía a 1, indicaba que no hubo cambio en el peso; mientras que un valor menor a 1, indicaba una disminución en el peso de las larvas, y si este era mayor que 1 (en todos los casos de evaluación), indicaba un aumento en el peso y por lo tanto no se presentaba algún efecto tóxico contra *Leptinotarsa texana*.

Al evaluar a las quince cepas sometidas a bioensayo en este trabajo, no se obtuvieron datos en el que el factor de crecimiento fuese menor a 1 (Apéndice H), por lo tanto no se presentó efecto alguno sobre larvas de *Leptinotarsa texana*.

Perfil de proteínas.

Los patrones de proteínas del complejo espora-cristal de las cepas de *B. thuringiensis* en estudio muestran bandas de distintos pesos moleculares (Figuras, 7 y 8).

De las cepas evaluadas que presentaron toxicidad contra *Manduca sexta* encontramos a la LBIT-1189, mientras que para *Aedes aegypti* fue la cepa LBIT-980. Los cristales de las cepas LBIT-980 y LBIT-1189 presentaron un patrón de proteínas totalmente diferentes como era de esperarse, ya que en el perfil de la cepa LBIT-980, se notan ligeramente tres bandas de, 128 kDa, 65 kDa y 27 kDa (Fig. 8, cuarto carril), que son características para cepas del Patotipo II, con actividad tóxica hacia Dípteros. Además esta cepa presentó un cristal de forma semiesférica (Apéndice I) lo cual coincide con lo reportado por Höfte y Whiteley (1989), quienes relacionan la forma del cristal con el Patotipo. Si bien esto no constituye un indicador absoluto, si representa un criterio de caracterización para las proteínas Cry4, Cry10 y Cry11 que pertenecen a *B. thuringiensis* serovar *israelensis*, además de un gen que codifica para una proteína de 28 kDa.

Mientras tanto, en la cepa LBIT-1189, se observaron bandas de 130 kDa, 95 kDa, 65 kDa, dos muy marcadas de 55 kDa, 50 kDa y una última banda posiblemente de 22kDa (Fig. 8, último carril), además de presentar una inclusión bipiramidal (Apéndice J), cuya presencia sugiere toxicidad para Lepidópteros, relacionado con las proteínas Cry1, las cuales las podemos encontrar en un gran número de serovares.

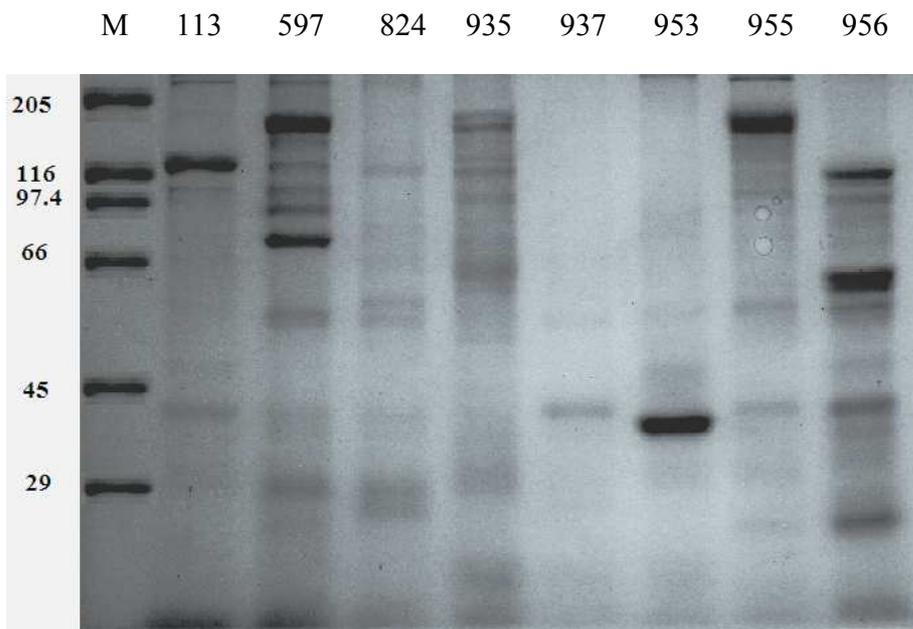


Figura. 7. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8%. Perfiles de proteínas de las cepas las nativas de *B. thuringiensis*. Carriles; 1) M: Marcador de peso molecular, 2) LBIT-113, 3) LBIT-597, 4) LBIT-824, 5) LBIT-935, 6) LBIT-937, 7) LBIT-953, 8) LBIT-955, y 9) LBIT-956. En kDa: Kilodaltones.

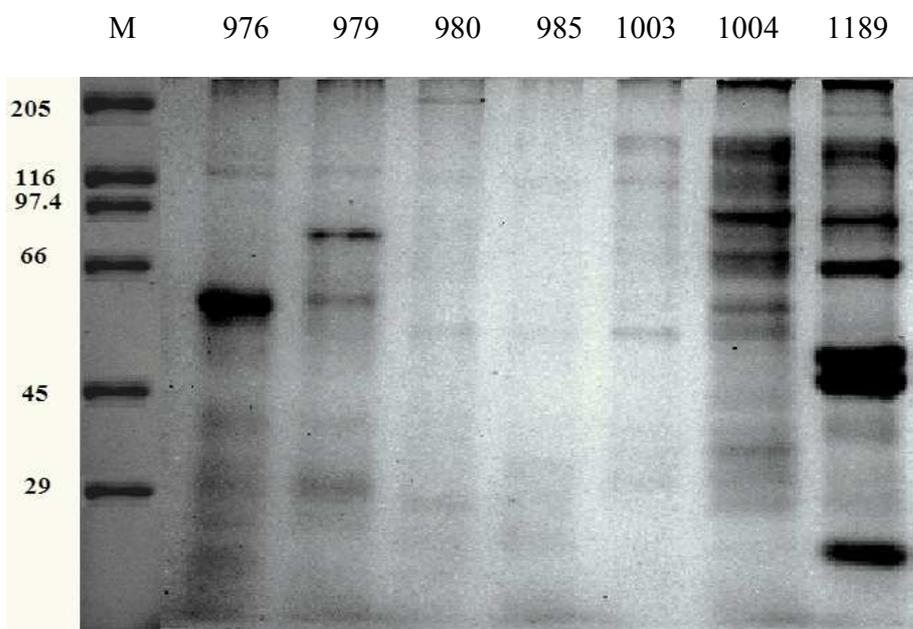


Figura. 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8%. Perfiles de proteínas de las cepas las nativas de *B. thuringiensis*. Carriles; 1) M: Marcador de peso molecular, 2) LBIT-976, 3) LBIT-979, 4) LBIT-980, 5) LBIT-985, 6) LBIT-1003, 7) LBIT-1004 y 8) LBIT-1189. En kDa: Kilodaltones.

Perfil de plásmidos.

Al obtener los perfiles de plásmidos de las quince cepas estudiadas, se pudo constatar que estas presentaron diferentes patrones de plásmidos con pesos moleculares muy variados, encontrándose desde megaplásmidos hasta plásmidos de muy bajo peso molecular (5 a 3 kb) (Fig. 9). Asimismo, se pudo corroborar que las cepas tóxicas contra *M. sexta* y *A. aegypti* (LBIT-1189 y LBIT-980, respectivamente) presentaron patrones de plásmidos totalmente diferentes entre sí (Fig. 10, carriles 5 y 9). Esto se correlaciona con el hecho de que ambas cepas presentan toxicidades hacia insectos de órdenes diferentes. También pudimos observar que las cepas 956, 1003 y 1004 presentaron perfiles de plásmidos muy similares entre sí, pero a su vez, totalmente diferentes a los de las cepas 980 y 1189 (Fig. 10). Estas diferencias pueden evidenciar el porqué las primeras cepas no presentaron toxicidad ni hacia *M. sexta* ni hacia *A. aegypti*, mientras que las dos últimas sí presentaron una alta actividad contra ambas especies de insectos.

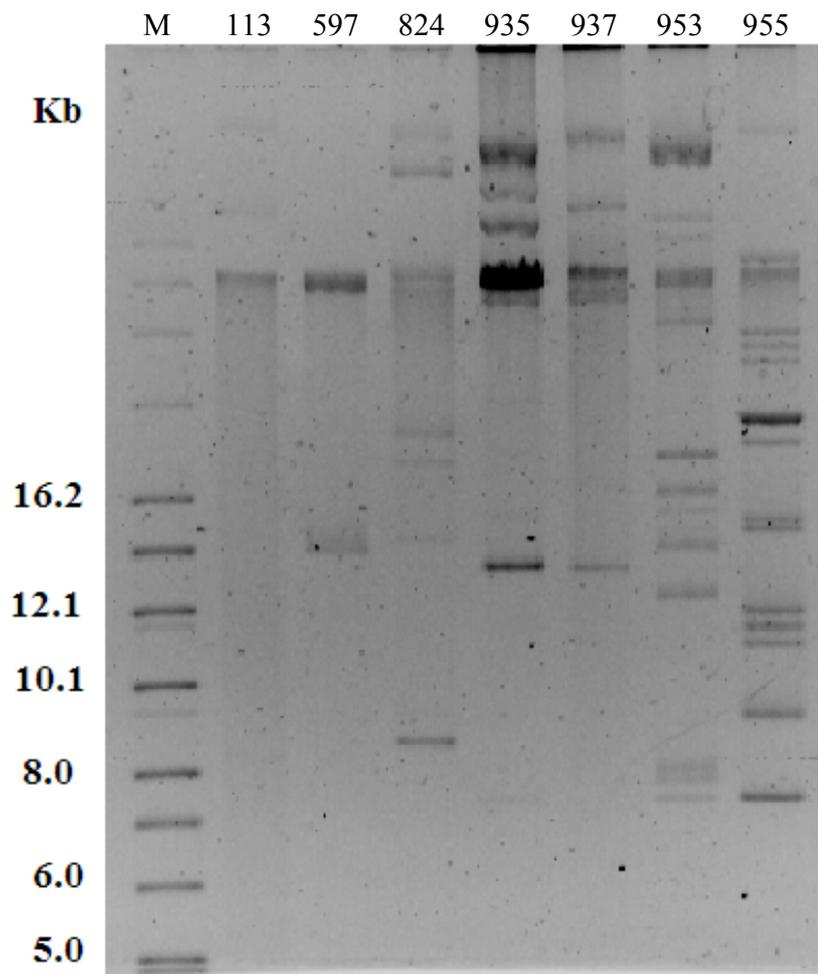


Figura. 9. Análisis electroforético de plásmidos en gel de agarosa al 0.5% de las cepas en estudio, Carril 1, M) Marcador de peso molecular, 2) LBIT-113, 3) LBIT-597, 4) LBIT-824, 5) LBIT-935, 6) LBIT-937, 7) LBIT-953 y 8) LBIT-955.

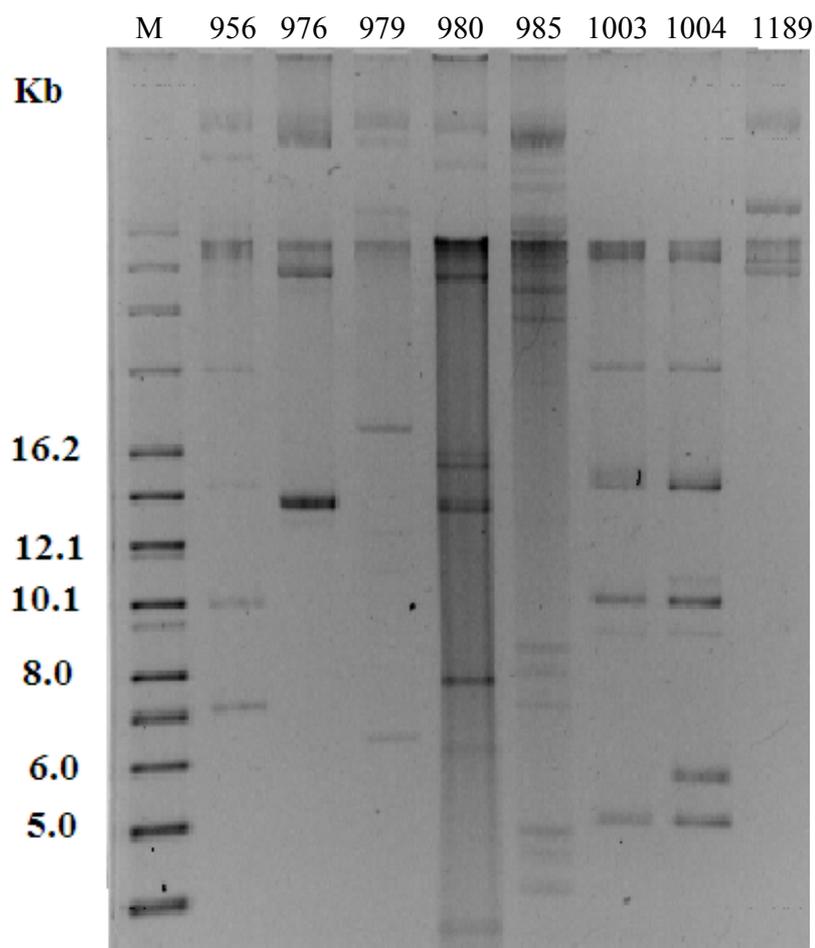


Figura. 10. Análisis electroforético de plásmidos en gel de agarosa al 0.5% de las cepas, Carril; 1) M: marcador de peso molecular, 2) LBIT-956, 3) LBIT-976, 4) LBIT-979, 5) LBIT-980, 6) LBIT-985, 7) LBIT-1003, 8) LBIT-1004 y 9) LBIT-1189.

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. Esto se pudo corroborar al analizar las diferentes cepas en este trabajo. En la cuadro 9 se presenta el perfil de plásmidos de seis cepas de *B. thuringiensis*, algunas de ellas generalmente son tomadas como referencia.

Cuadro. 9. Cepas tipo seleccionadas de *B. thuringiensis* y su contenido de plásmido.

Cepa	Serotipo	Número de Plásmidos	Peso molecular (Kb)	Referencia
<i>thuringiensis</i> HD2	1	10	5.2, 6.2, 7.2, 7.6, (10.3) 32, 37, 54, 58, 75,	González y Carlton, 1980.
<i>kurstaki</i> HD1	3 ^a 3b	11	1.9, (2.9), 4.8, 5.2, 5.4, 9.3, (11), (12.5), 28, 43, 52	González y Carlton, 1980.
			1.4, 4.9, 5.2, 5.4, 9.3, 10, 29, 44, 52, ~110, ~120	González <i>et al</i> , 1982.
<i>kurstaki</i> HD73	3 ^a 3b	7	4.8, 5.2, 5.4, 6.7, 7.4, (11), 52	González y Carlton, 1980.
		6	4.9, 5.2, 5.4, 7.4, 50, 50	González <i>et al</i> , 1982.
<i>alesti</i> HD4	3 ^a	8	4.5, 4.8, 5.4, <u>6.2</u> , 6.4, 34, 37, 45	González y Carlton, 1980.
<i>galleriae</i> HD8	5 ^a 5b	3	5.2, <u>8.7</u> , 10.3	González y Carlton, 1980.
<i>Israelensis</i>	14	7	3.2, 4.1, 4.9, 10.5, 66, 72, ~110	Ward y Ollar, 1983.
		6	3.2, 4.1, 4.9, 10.6, 65, 75	Ibarra y Federici, 1986.

Los pesos moleculares subrayados son aquellos plásmidos que se aislaron predominantemente en forma relajada (Circular abierto CO), los pesos en paréntesis son aquellos plásmidos que se presentan en menor cantidad en relación al total de plásmido.

CONCLUSIONES

Existe un efecto sinérgico tóxico entre la espora y el cristal de *B. thuringiensis* para las cepas LBIT-1189 y LBIT-980, contra larvas de primer instar de *Manduca sexta* y larvas de cuarto instar temprano de *Aedes aegypti*, respectivamente.

Las cepas LBIT-980 y LBIT-1189, tienen un efecto letal para larvas de *Aedes aegypti* y *Manduca sexta*, esta última con un nivel altamente tóxico hacia el gusano del cuerno del tabaco (*M. sexta*),

Aún y que en México se han evaluado cepas de *B. thuringiensis* contra el gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*) y *Aedes aegypti*, la gran mayoría de ellas se han evaluado empleando otros criterios distintos a los que se siguieron en este trabajo, motivo por el cual no se conoce su identidad. De ahí la importancia de su evaluación, ya que demuestra la existencia de nuevas cepas nativas de *B. thuringiensis*. Las cepas LBIT-1189 poseen potencial insecticida, y se ubican dentro del rango de actividad y eficacia de las cepas de *B. thuringiensis* con actividad hacia *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*, que se distribuyen comercialmente. Estas cepas podrían desarrollarse como bioinsecticidas alternativos para el control del gusano cuerno del tabaco y para el control de mosquitos transmisores de enfermedades.

Morfológicamente el cristal bipiramidal, patrones proteicos y plasmidicos, son evidencia de que la cepa LBIT-1189 pertenece al Patotipo I, con efecto tóxico típicamente a lepidópteros, y estas características frecuentemente pueden observarse en algunas cepas de serovares de *thuringiensis* y *kurstaki*. Los cristales semiesféricos u ovoides son un tipo de morfología estrechamente relacionado a *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, por lo que presentan un espectro de acción tóxico típico hacia dípteros.

LITERATURA CITADA

- Agaisse, H., M. Gominet, O.A. Okstad, A.B. Kolsto and D. Lereclus. 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol. 32: 1043-1053.
- Aldebis, H. K.; Vargas,-Osuna, E. and Santiago-Alvarez, C., 1994. Serological characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner strain isolated from Spanish insects. Bol. San. Veg. plagas 20(3) 765-769.
- Barboza-Corona, E., E. Nieto-Mazzocco, R. Velásquez-Robledo, R. Salcedo-Hernández, M. Bautista, B. Jiménez, J.E. Ibarra. 2003. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1023-1029.
- Beegle, C. C., Yamamoto, T. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. Can. Entomol. 124:587-616.
- Bravo, A. 2001. Proteínas Insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. In: Caballero, P., Ferre J. (Eds.), Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* En el Control Integrado de Plagas. PHITOMA-España, Navarra, España, pp. 71-86
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J. Zhuang, M., Gill, S.S., Sobero´n, M., 2004. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. Biochem. Biophys. Acta. 1667, 38–46.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: date and hypotheses. Appl. Environ. Microbiol. 69:2415-2422.
- Campbell, D.P., Dieball, D.E. and Brackett, J.M. 1987. Rapid HPLC assay for the exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Agriculture Food Chemistry. 35: 156-158.
- Cannon, R. 1989. Microbial insecticides: The opening of a new era? Shell Agriculture 5:13-15.
- Carlberg, G. 1986. *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. MIRCEN Journal. 2: 267-274.
- Carlberg, G., Kihamia, C.M. and Minjas, J. 1985. Microbial control of flies in latrines in Dar es Salaam with a *Bacillus thuringiensis* (serotype 1) preparation, Muscabac. MIRCEN. Journal of Applied Microbiological Biotechnology. 1: 33-44.
- Carlson, C. R., and A.-B. Kolstø. 1993. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. J. Bacteriol. 175:1053-1060.
- Carlson, C. R., D. A. Caugant, and A.-B. Kolstø. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 60:1719-1725.

- Carlson, C. R., T. Johansen, M.-M. Lecadet, and A.-B. Kolstø. 1996. Genomic organization of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715. *Microbiology* 142:1625-1634.
- Carreras, B., Bravo A y J.F. Sánchez. 2003. Unión *in vitro* De Las δ -endotoxinas De *Bacillus thuringiensis* Al Epitelio Intestinal Medio De *Manduca sexta*. *Rev. Protección Veg.* 18:(1) 28-31
- 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.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Bravo, A. and Dean, D.H. Junio 1 de 2005. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature". http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/
- De Leon-Hernandez, T. J. 1994. Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* toxicas a *Leptinotarsa texana* (Coleoptera:chrysomelidae): selección y caracterización. Tesis de Maestria. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México, México. Pp.120.
- De Maagd RA, Bravo A, and Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17:193–99.
- Del Rincón-Castro, M. C., J. Méndez-Lozano y J. E. Ibarra. 2006. Caracterización de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Nuctuidae) *Folia Entomol. Mex.* 45 (2): 157-164.
- Denholm, I. and Rowland, M. W. 1992. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and practice. *Ann. Rev. Entomol.* 37:91-112.
- Donovan, W. P, Y. Tan, and A. C. Slaney. 1997. Cloning of the *nprA* Gene for neutral Protease A of *Bacillus thuringiensis* and Effect of In Vivo Deletion of *nprA* on Insecticidal Crystal Protein. *Applied and Environmental Microbiology.* 63: 2311–2317.
- Estruch, J.J., and C. G. Yu. 2001. Plant pest control. U.S. patent 6.291.156 BI.
- Estruch, J.J., G. W., Warren, M.A., Mullins, G.J. Nye, J.A., Craig and M.G.Coziel. 1996. VIP3A a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5389-5394.

- Fedhila S, Guillemet E, Nel P, Lereclus D. 2004. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* genes identified by in vivo screening of virulence factors. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4784-4791.
- Fedhila, S. T. Msadek, P. Nel, D. Lereclus. 2002. Distinct *clpP* genes control specific adaptive responses in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 184: 5554-5562.
- Feitelson, J. S., Payne, J., Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* 10:271-275.
- Fernández, L. E., K. G. Amanova., S. S. Gill., A. Bravo and M. Soberon. 2006. “A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae”, en *Biochemical Journal*, 394.
- Fernandez-Larrea, AO, 1999. Review of *Bacillus thuringiensis* production and use in Cuba. *Biocontrol News and information* 20 (1): 47-49
- Fernández-Larrea, O. 2002. Tecnologías de Producción de *Bacillus thuringiensis*. Manejo integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 64: 110-115.
- Gallegos-Morales, G. M, Cepeda-Siller. E. Aranda-Herrera. L. O. Tejada.Molina. y D. Enkerlin S. 2003. Evaluacion del efecto de *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) sobre larvas del segundo estadio de *Trichoplusia ni* (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE). *Agrociencia*, 37: 405-411.
- Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, D.J. Beecher, M. Gominet, D. Lereclus, A.C.L. Wong, S. Senesi. 2002. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*184: 6424-6433.
- Gonzalez, J. M. and B. C. Carlton. 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 3:92-98.
- Gonzalez, J. M. JR., B. J. Brown. and B. C. Carlton. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* Plasmid coding for δ -endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:6951-6955.
- Guevara, O. E., G. Armengol., N. Crickmore y S. Orduz. 2004. Expresión de la toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis en *Asticcacaulis excentricus*, para el control de larvas acuáticas de dípteros de la familia Culicidae, vectores de enfermedades. *Rev. Colombiana de Biotecnología.* Vol. (1): 24-30
- Hernández C. S., J. Ferre and I. Larget-Thiery. 2001. Update on the detection of β -exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis. *Journal of Applied Microbiology.* 90: 643-647
- Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.

- Ibarra y Del Rincon-Castro. 2001. Cuantificación Toxicología de *Bacillus thuringiensis*. In: Caballero, P., Ferre J. (Eds.), Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* En el Control Integrado de Plagas. PHITOMA-España, Navarra, España, pp. 133-152.
- Ibarra, J. E. and B. A. Federici. 1987. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Ass.* 3: 187-192.
- Ibarra, J.E. and Federici, B.A. 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 165(2):527-533.
- Ibarra, J.E., M.C. del Rincón, S. Orduz, D. Noriega, G. Benintende, R. Monnerat, L. Regis, C.M.F. de Oliveira, H. Lanz, M.H. Rodríguez, J. Sanchez, G. Peña and 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. y Caballero, P. 2001. Biología y Ecología de *Bacillus thuringiensis*. In: Caballero, P., Ferre J. (Eds.), Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* En el Control Integrado de Plagas. PHITOMA-España, Navarra, España, pp. 15-44
- Krieg, A. and Langenbruch, G. A., 1981. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: Burges. H.D. (Ed), Microbial control of pest and plant Diseases 1970-1980. Academic Press, London, pp. 837-896
- Lee, M.K., F.S. Walters, H. Hart, N. Palekar, J-S. Chen. 2003. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4648-4657.
- Lee, S.J., S-Y. Park, J-J. Lee, D-Y. Yum, B-T. Koo, J-K. Lee. 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3919-3924.
- Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gominet, S. Salamitou, and V. Sanchis. 1996. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J. Bacteriol.* 178: 2749-2756.
- Levinson, B. L., K. J. Kasyan, S. S. Chiu, T. C. Currier, and J. M. J. Gonzalez. 1990. Identification of beta exotoxin production, plasmids encoding beta exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.* 172: 3172-3179.

- Manasherob, R., A. Zaritsky, E. Ben-Dov, D. Saxena, D. Barak, and M. Einav. 2001. Effect of accessory proteins P19 and P20 on cytolytic activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 43: 355-364.
- Manasherob, R., Ben-dov, E., Zaritsky, A., Barak, Z. 1998. "Germination, growth, and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *tetrahymena pyriformis*". *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1750-1758.
- Manceva, S. D., M. Puztai-Carey, and P. Butko. 2004. Effect of pH and ionic strength on the cytolytic toxin Cyt1A: a fluorescence spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1699: 123–130.
- Martinez, C., M. Porcar., A. Lopez., R. De Escudero., F. J. Perez-Llarena, and P. Caballero. 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol Exp Appl.*, 111 : 71-77
- Navon, A. 2000. Bioassays of *Bacillus thuringiensis* products used against agricultural pests. CAB International. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes (eds. A. Navon and K.R.S. Ascher). pp. 1-24.
- Navon, A., 1993. Control of lepidopteran pest whit *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide: theory and practice* (P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs, eds.) pp. 125-146, John Wiley & Sons, New York.
- Nester, E., Thomashow, L.S., Metz, M., Gordon, M. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment. Recurso en línea: <http://www.asmusa.org>
- Niedmann L. L y Meza, B. L. 2006. Evaluación de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* Como una Alternativa de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agric. Téc.* 66 (3) 235-246.
- Riuz-De Escudero I., I. Ibañes, M. A. Padilla, A. Carnero, P. Caballero. 2004. Isolation and characterization of new *Bacillus thuringiensis* strains in soils of the Canary Islands. *Bol. San. Veg. plagas*, 30: 703-712.
- Rowe, G. E. and Margaritis, A. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticidas by *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnologi* 6 (2): 87-127.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, and M.-M. Lecadet. 1988. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.* 2:393-404.
- 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.

- Shao, Z., Z. Liu, Z. Yu. 2001. Effects of the 20 kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5362-5369.
- Silva-Wernek, J. O. and D. J. Ellar. 2008. Characterization of a novel Cry9Bb δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of invertebrate Pathology.* 98. 320-328.
- Sobero M.,L. E. Fernandez., C. Perez., S. S. Gillb, A. Bravo. 2007. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon.* 49: 597-600
- Vargas, V. F. 2001. Producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis Utilizando Esparrago (*Asparagus officinalis*) Y su uso potencial Para el control de la Malaria En La Libertad – Perú. *Rev. Med. Exp.* 18 (3-4) 82-89.
- Ward, E. S and D. J. Ellar. 1983. Assignment og the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* Var. israelensis to a specific plasmid by curing analysis. *FEBS Lett.* 158:45-49.
- Warren, G.W. 1997. Vegetative insecticidal protein: novel proteins for control of corn pests. P. 109-121. In N. Carozzi and M. Koziel (ed), *Advances in insect control.* Taylor & Francis, Bristol, Pa. 123-138
- Xu, Z., Yao, B., Sun, M., Yu, Z. 2004. Protection of mice infected with *Plasmodium berghei* by *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Parasitol. Res.* 92: 53-57.
- Yu, C.G., M.A. Mullins, G.W., Warren, M.G., Koziel, and J.J. Estruch. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 532-536.

APÉNDICE

A) DIETA ARTIFICIAL PARA EL GUSANO DEL CUERNO DEL TABACO

Manduca sexta

12.5 g Kappa carragenina

1000 ml agua destilada

Ingredientes del Grupo I:

80 g Germen de Trigo

36 g Caseinato de calcio (Caseína)

32 g Sacarosa (azúcar)

16 g Levadura de cerveza

12 g Mezcla de sales de Wesson

2 g Ácido sórbico

10 g Mezcla de vitaminas de Vanderzant

1 g Metil-Paraben

4 g Ácido ascórbico

3 g Colesterol

Ingredientes del Grupo II:

0.25 g Tetraciclina

1 ml Formaldehído 37%

4 ml Aceite de Linaza

B) AMORTIGUADOR DE DESNATURALIZACIÓN (10 ML) “DE CARGA “

Tris 0.5 M pH 6.8 5 ml

SDS 20 % 2 ml

Glicerol 2 ml

2 β-mercaptoetanol 1 ml

Azul de bromofenol 0.02 % 1 ml

Almacenar a 4⁰C

C) GEL DE SEPARACIÓN 10%

Agua 3.63 ml

Acrilamida/ Bisacrilamida (30 / 0.08 %) 2.5 ml

Tris 1M 3.73 ml

SDS 10% (Dodecil sulfato de sodio 10 %) 100 μl

Temed (N, N, N', N Tetrametil etilen diamina) 10 μl

PSA (Persulfato de amonio 10 %) 70 μl

D) GEL DE CONCENTRACION 3 %

Archilamida / Bisacililamida (30 / 0.08 %)	675	μl
Tris 1.25 M (pH 6.8)	500	μl
Agua	3.45	ml
SDS 10% (Dodecil sulfato de sodio 10 %)	50	μl
Teme (N, N, N', N Tetrametil etilen diamina)	10	μl
PSA (Persulfato de amonio 10 %)	70	μl

E) AZUL DE COOMSIE “TINCIÓN”

Azul de coomasie	Para 100 ml	Para 500 ml
Azul brillante de coomasie	250 mg	1250 mg (1.25 g)
Metanol	45 ml	225 ml
Ácido acético	9 ml	45 ml
Agua	46 ml	230 ml

F) SOLUCIÓN PARA DESTENIR LOS GELES “DESTINCION”

Ácido acético	75 ml
Metanol	50 ml
Agua	875 ml

G) MEDIO LB

Bacto Triptona	10	g
Extracto de levadura	5	g
NaCl	10	g
Agua	1	L

AMORTIGUADOR DE CORRIDA (SDS-PAGE) “BUFFER DE CORRIDA”

Tris-HCl 0.05 M
Glicina 0.03 M
SDS 0.1 %
pH 8.8

H) FACTOR DE CRECIMIENTO para *Leptinotarsa texana*

FC= PF/PI

FC: factor de crecimiento

PF: peso final

PI: peso inicial

Si es mayor a 1 no existe efecto y hay aumento en el peso

Si es menor a 1 hay disminución de peso y existe un efecto

Numero de larva Cepa LBIT-113											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0300	0,0255	0,0279	0,0173	0,0294	0,0245	0,0262	0,0264	0,0244	0,0274	
PF	0,0482	0,0233	0,0348	0,0178	0,0361	0,0309	0,0246	0,0316	0,0354	0,0333	
	1,6067	0,9137	1,2473	1,0289	1,2279	1,2612	0,9389	1,1970	1,4508	1,2153	1,2088

No. De larva Cepa LBIT-597											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0214	0,0185	0,0274	0,0312	0,0242	0,0261	0,0293	0,0318	0,0334	0,0227	
PF	0,0216	0,0229	0,0234	0,0316	0,0191	0,0165	0,0404	0,0529	0,0467	0,034	
	1,0093	1,2378	0,8540	1,0128	0,7893	0,6322	1,3788	1,6635	1,3982	1,4978	1,1474

No. De larva Cepa LBIT-824											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0280	0,0261	0,0308	0,026	0,0246	0,0208	0,0243	0,0219	0,0244	0,0315	
PF	0,0254	0,0234	0,0383	0,045	0,0375	0,0266	0,0246	0,0129	0,0411	0,0354	
	0,9071	0,8966	1,2435	1,7308	1,5244	1,2788	1,0123	0,5890	1,6844	1,1238	1,1991

No. De larva TESTIGO											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0225	0,0242	0,0266	0,0286	0,0234	0,0225	0,0304	0,0267	0,0205	0,027	
PF	0,0305	0,0295	0,0325	0,034	0,0299	0,027	0,0454	0,0344	0,0279	0,046	
	1,3556	1,2190	1,2218	1,1888	1,2778	1,2000	1,4934	1,2884	1,3610	1,7037	1,3309

No. De larva Cepa LBIT-935											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0284	0,0311	0,038	0,033	0,0386	0,0308	0,0275	0,0254	0,0319	0,0374	
PF	0,0246	0,0433	0,0568	0,043	0,0596	0,0406	0,0329	0,0267	0,0309	0,043	
	0,8662	1,3923	1,4947	1,3030	1,5440	1,3182	1,1964	1,0512	0,9687	1,1497	1,2284

No. De larva Cepa LBIT-937											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0266	0,0321	0,0315	0,0262	0,0224	0,03	0,0285	0,0226	0,0262	0,0322	
PF	0,0236	0,0422	0,0342	0,0289	0,0247	0,0227	0,0603	0,0427	0,0717	0,0773	
	0,8872	1,3146	1,0840	1,1031	1,1027	0,7567	2,1158	1,8894	2,7366	2,4006	1,5391

No. De larva Cepa LBIT-953											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0208	0,023	0,0352	0,0283	0,0202	0,0215	0,027	0,0372	0,0278	0,0263	
PF	0,0355	0,0298	0,0486	0,0566	0,0453	0,0417	0,0452	0,0302	0,0359	0,0396	
	1,7067	1,2957	1,3807	2,0000	2,2426	1,9395	1,6741	0,8118	1,2914	1,5057	1,5848

Numero de larva TESTIGO											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,027	0,0285	0,0221	0,0196	0,0221	0,0237	0,0328	0,0314	0,0226	0,025	
PF	0,0336	0,0357	0,0337	0,0253	0,0286	0,0284	0,0511	0,0675	0,0397	0,026	
	1,2444	1,2526	1,5249	1,2908	1,2941	1,1983	1,5579	2,1497	1,7566	1,0400	1,4309

No. De larva Cepa LBIT-955											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0426	0,041	0,028	0,0407	0,0463	0,0441	0,0274	0,0327	0,0407	0,0495	
PF	0,0858	0,0466	0,0588	0,0829	0,0961	0,0439	0,0449	0,0672	0,0723	0,0419	
	2,0141	1,1366	2,1000	2,0369	2,0756	0,9955	1,6387	2,0550	1,7764	0,8465	1,6675

No. De larva Cepa LBIT-956											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0281	0,0299	0,0301	0,0328	0,029	0,0391	0,0214	0,0223	0,0272	0,0322	
PF	0,0664	0,06	0,1042	0,0793	0,0674	0,0443	0,0631	0,0224	0,0699	0,0631	
	2,3630	2,0067	3,4618	2,4177	2,3241	1,1330	2,9486	1,0045	2,5699	1,9596	2,2189

No. De larva Cepa LBIT-976											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0353	0,0312	0,0288	0,0315	0,0336	0,047	0,0335	0,029	0,0378	0,0378	
PF	0,0734	0,0476	0,0912	0,0808	0,0653	0,0925	0,0728	0,0735	0,0932	0,0772	
	2,0793	1,5256	3,1667	2,5651	1,9435	1,9681	2,1731	2,5345	2,4656	2,0423	2,2464

No. De larva Cepa LBIT-979											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,036	0,0244	0,0336	0,0257	0,0397	0,0313	0,0345	0,267	0,024	0,0434	
PF	0,0535	0,0758	0,0782	0,0693	0,1000	0,0837	0,0324	0,0804	0,0836	0,1168	
	1,4861	3,1066	2,3274	2,6965	2,5189	2,6741	0,9391	0,3011	3,4833	2,6912	2,2224

No. De larva Cepa LBIT-980											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0295	0,0369	0,0314	0,0293	0,0278	0,0295	0,0223	0,0379	0,0391	0,0379	
PF	0,0766	0,088	0,0761	0,0833	0,0373	0,0892	0,0648	0,1016	0,0916	0,1147	
	2,5966	2,3848	2,4236	2,8430	1,3417	3,0237	2,9058	2,6807	2,3427	3,0264	2,5569

No. De larva Cepa LBIT-985											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0373	0,0357	0,041	0,0307	0,0376	0,0383	0,0321	0,0314	0,0368	0,0325	
PF	0,1223	0,0913	0,0324	0,0836	0,0355	0,0948	0,1012	0,081	0,1052	0,0752	
	3,2788	2,5574	0,7902	2,7231	0,9441	2,4752	3,1526	2,5796	2,8587	2,3138	2,3674

No. De larva TESTIGO											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,031	0,0337	0,0544	0,0578	0,0356	0,0332	0,0444	0,0414	0,0351	0,0334	
PF	0,1147	0,085	0,1318	0,1334	0,1117	0,1039	0,1032	0,1343	0,1025	0,1016	
	3,7000	2,5223	2,4228	2,3080	3,1376	3,1295	2,3243	3,2440	2,9202	3,0419	2,8751

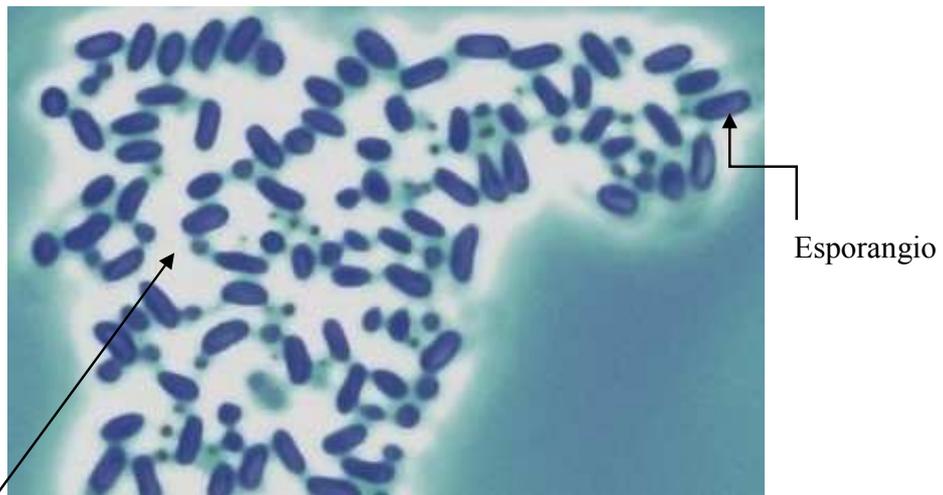
No. De larva Cepa LBIT-1003											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0356	0,0299	0,0283	0,0416	0,0376	0,0465	0,0419	0,0409	0,0369	0,0327	
PF	0,05	0,0104	0,1151	0,1486	0,1304	0,1385	0,1366	0,1095	0,1234	0,11	
	1,4045	0,3425	4,0671	3,5721	3,4681	2,9785	3,2601	2,6773	3,3442	3,3639	2,8478

No. De larva Cepa LBIT-1004											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0282	0,0327	0,0337	0,0353	0,0318	0,0385	0,0297	0,0281	0,0408	0,0357	
PF	0,1103	0,1155	0,1319	0,1091	0,1047	0,104	0,1129	0,1031	0,0966	0,1281	
	3,9113	3,5321	3,9139	3,0907	3,2925	2,7013	3,8013	3,6690	2,3676	3,5882	3,3868

No. De larva Cepa LBIT-1189											Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,038	0,0334	0,04	0,0371	0,0368	0,042	0,0385	0,0332	0,0356	0,0362	
PF	0,1246	0,1117	0,1262	0,1288	0,1217	0,1249	0,1436	0,1157	0,113	0,1233	
	3,2789	3,3443	3,1550	3,4717	3,3071	2,9738	3,7299	3,4849	3,1742	3,4061	3,3326

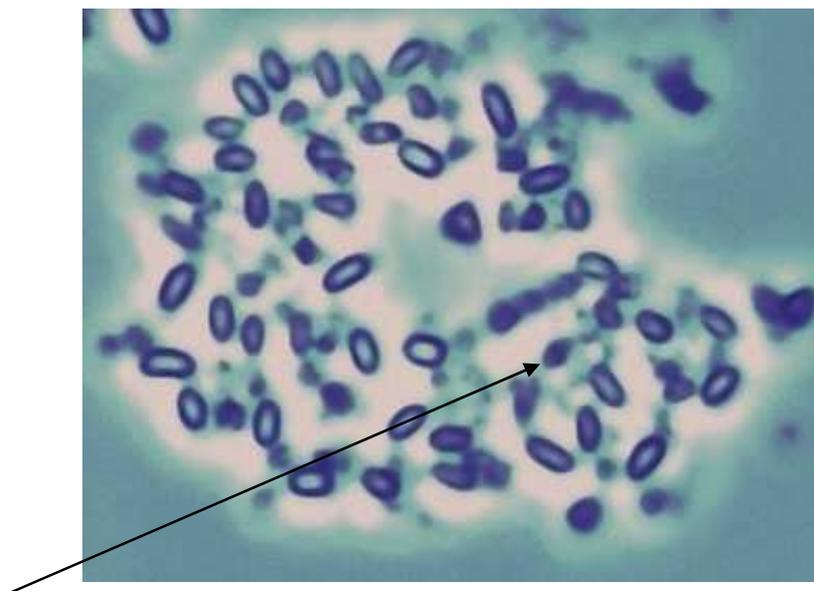
	No. De larva TESTIGO										Media
Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PI	0,0334	0,0342	0,0378	0,0414	0,0331	0,0436	0,0385	0,0366	0,0341	0,0334	
PF	0,1496	0,145	0,1461	0,1371	0,1171	0,1349	0,0978	0,131	0,1211	0,1259	
	4,4790	4,2398	3,8651	3,3116	3,5378	3,0940	2,5403	3,5792	3,5513	3,7695	3,5968

I) CRISTALES SEMIESFÉRICOS DE LA CEPA LBIT-980



Cristal semiesférico característico del Patotipo II de *Bacillus thuringiensis*.

J) CRISTALES BIPIRAMIDALES DE LA CEPA LBIT-1189



Crista bipyramidal característico del Patotipo I, de *Bacillus thuringiensis*

K) MEDIO LECHE PEPTONIZADA (MLP)

PREPARACION DE MEDIOS (BIOINSECTICIDAS)

LECHE PEPTONIZADA (Bt)							
AGUA(ML)	LECHE PEPT.	DEXTROSA	EXT. LEV.	MgSO ₄ *7H ₂ O	FeSO ₄ *7H ₂ O	ZnSO ₄ *7H ₂ O	MnSO ₄
100	1.0000	0.7000	0.2000	0.0300	0.0020	0.0020	0.0020
120	1.2000	0.8400	0.2400	0.0360	0.0024	0.0024	0.0024
160	1.6000	1.1200	0.3200	0.0480	0.0032	0.0032	0.0032
200	2.0000	1.4000	0.4000	0.0600	0.0040	0.0040	0.0040
300	3.0000	2.1000	0.6000	0.0900	0.0060	0.0060	0.0060
360	3.6000	2.5200	0.7200	0.1080	0.0072	0.0072	0.0072
400	4.0000	2.8000	0.8000	0.1200	0.0080	0.0080	0.0080
500	5.0000	3.5000	1.0000	0.1500	0.0100	0.0100	0.0100
600	6.0000	4.2000	1.2000	0.1800	0.0120	0.0120	0.0120
750	7.5000	5.2500	1.5000	0.2250	0.0150	0.0150	0.0150
1000	10.0000	7.0000	2.0000	0.3000	0.0200	0.0200	0.0200
1080	10.8000	7.5600	2.1600	0.3240	0.0216	0.0216	0.0216
1500	15.0000	10.5000	3.0000	0.4500	0.0300	0.0300	0.0300

Nota: antes de esterilizar ajustar el pH a 7.5.