

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**Caracterización molecular de cepas de *Bacillus*
Thuringiensis con propiedades entomocidas, para
vectores transmisores de enfermedades metaxénicas
(dengue)**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Doris Virginia Huerta Canales

Lima – Perú

2013

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. ARMANDO YARLEQUE CHOCAS (Presidente)

Dra. HILDA MARÍA SOLÍS ACOSTA (Miembro)

Dr. PABLO S. RAMIREZ ROCA (Miembro)

Dr. PEDRO L. CASTELLANOS SÁNCHEZ (Miembro)

Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA (Asesor)

Dedicatoria

Dedico este trabajo a lo más grande y hermoso que Dios me ha dado, Mi Familia, especialmente a mis padres, gracias papá Suito por haber sido mi motor y guía, sé que me sigues acompañando. Gracias mamá Chela por tu ejemplo de fortaleza y decisión, gracias porque a ustedes les debo la vida y lo que soy.

A mi amado esposo Guillermo y a mis adorados hijos Omar y Alonso, por su cariño y paciencia y porque en todo momento me comprendieron, apoyaron y me incentivaron a terminar este trabajo, gracias por el tiempo que me regalaron y que no compartí con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que durante la realización de este trabajo me dieron su apoyo y brindaron su amistad y consejos.

A mi asesor Dr. Abad Flores Paucarima, mi especial reconocimiento.

A los miembros del Jurado Dr. ARMANDO YARLEQUE CHOCAS (Presidente), Dra. HILDA MARÍA SOLÍS ACOSTA (Miembro,) Dr. PABLO S. RAMIREZ ROCA (Miembro), Dr. PEDRO CASTELLANOS SÁNCHEZ (Miembro), Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA (Asesor), por las sugerencias y correcciones.

Al Biólogo Jorge Benavides por la oportunidad que me dio de entrar en su equipo de trabajo en el INIA, por su confianza, apoyo profesional y por sus sabios consejos.

A mis amigos del INIA, Yenni, Eudocio, Claudia, Cecilia, gracias por su amistad, consejos y especialmente al Biólogo Fernando Serna del INIA, por su permanente apoyo y colaboración en el desarrollo de una etapa de la tesis.

Al Dr Lewis de la Universidad de Oklahoma por haberme facilitado la visita a su Laboratorio del Stephenson Research Center y a los Biólogos Raúl Tito, Alexandra Tito y Susan Polo por su amistad y apoyo en este trabajo.

Al Biólogo Oscar Acosta Conchucos, por sus apreciaciones e incondicional apoyo en la culminación de la tesis, gracias por la orientación en el análisis estadístico.

A todos mis colegas, amigos y compañeros del CIBN, por su amistad, constante motivación y ánimo en los momentos más difíciles, gracias Inés, Silvia, Rubén, Milagros, Cecilia, Mercedes, Dora, Mario, Olga, Clever, Miguel y especialmente a Raquel y al Dr. Ayala, desde donde estén sé que han seguido apoyándome.

TABLA DE CONTENIDOS	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. HISTORIA	4
2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES	6
2.3. CRISTALES PARASPORALES	10
2.4. MECANISMO DE ACCIÓN	12
2.5 FACTORES GENÉTICOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.5.1. GENOMA DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.5.2 GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS INSECTICIDAS Cry	15
III. OBJETIVOS DE LA TESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	17
4.1.1. CEPAS NATIVAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
4.1.2. CEPAS REFERENCIALES DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
4.1.3. LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	18
4.2 MATERIALES	18
4.3 MÉTODOS	18
4.3.1. RECONOCIMIENTO DE CUERPOS PARAESPORALES EN <i>Bacillus thuringiensis</i> NATIVOS	18
4.3.2 AISLAMIENTO DE DNA DE CEPAS NATIVAS Y ESTÁNDAR	19
4.3.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
4.3.2.1.1 CUANTIFICACIÓN DEL DNA	19
4.3.2.2 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO	20
4.3.3 OBTENCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL	21
4.3.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	21
4.3.4.1 ELECTROFORESIS PAGE/SDS	21
4.3.5. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE GENES <i>cry</i> y <i>cyt</i> EN CEPAS DE <i>B. thuringiensis</i> SELECCIONADAS	22
4.3.5.1 PRIMER PCR U OLIGONUCLEÓTIDO CEBADOR	22

	Pág.
4.3.5.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>cry</i> y <i>cyt</i> POR EL MÉTODO DEL PCR	23
4.3.5.3 EL SEGUNDO PROTOCOLO ESTANDARIZADO PARA <i>B. thuringiensis</i> , UTILIZÓ DNA PLASMÍDICO PURIFICADO	24
4.3.6 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA CON SECUENCIAS REP	24
4.3.6.1 ANÁLISIS DE PATRONES DE BANDAS REP PCR	25
4.3.7 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	25
4.3.8 SECUENCIAMIENTO	26
4.3.8.1 PURIFICACIÓN DE PCR PARA SECUENCIAMIENTO	26
4.3.8.2 SECUENCIAMIENTO DEL DNA PLASMÍDICO	26
4.3.8.3 ANÁLISIS DE DATOS	26
4.3.9 BIOENSAYOS DE ENTOMOTOXICIDAD	26
4.3.9.1 OBTENCIÓN DE FORMAS LARVARIAS DE MOSQUITOS	27
4.3.9.2 ESTABLECIMIENTO DE COLONIAS DE MOSQUITOS	27
4.3.9.3 BIOENSAYO PRELIMINAR DE TOXICIDAD EN LABORATORIO	27
4.3.9.4 ANÁLISIS DE ENTOMOTOXICIDAD	28
V. RESULTADOS	29
5.1 PROTEÍNAS CRY	32
5.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE GENES <i>cry</i> y <i>cyt</i> CON REP PCR	33
5.3 DETERMINACIÓN DE GENES <i>cry</i> Y GENES <i>cyt</i>	37
5.4 SECUENCIAMIENTO DE GENES <i>cry</i> y <i>cyt</i>	49
5.5 BIOENSAYOS DE ENTOMOTOXICIDAD DE <i>B. thuringiensis</i> SOBRE <i>Aedes aegypti</i>	53
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
6.1 VARIEDAD DE INCLUSIONES CRISTALINAS DE AISLADOS DE <i>B. thuringiensis</i>	59
6.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Cry y Cyt EN CEPAS DE <i>B. thuringiensis</i>	60
6.3 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE GENES <i>cry</i> y <i>cyt</i> DE <i>B. thuringiensis</i> CON REP- PCR	62
6.4 ANÁLISIS DE LOS GENES <i>cry</i> y <i>cyt</i> DE <i>B. thuringiensis</i>	66
6.5 SECUENCIAMIENTO DE GENES <i>cry</i> Y GENES <i>cyt</i>	72
6.6 BIOENSAYO DE ENTOMOTOXICIDAD DE <i>B. thuringiensis</i>	74

VII. CONCLUSIONES	77
VIII RECOMENDACIONES	79
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
TABLA 1A	Cepas estándar de <i>B. thuringiensis</i> evaluadas para REP-PCR Genes <i>cry</i> y <i>Cyt</i> .	29
TABLA 1B	Cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> evaluadas para REP –PCR Genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> .	30
TABLA 2	Agrupamientos derivados del dendograma de similitud de cepas nativas y estándar evaluadas.	36
TABLA 3	<i>Primers</i> utilizados para evaluar diversidad con REP-PCR e identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> .	38
TABLA 4	Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> estándar.	39
TABLA 5	Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> procedentes de Junín.	40
TABLA 6	Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> procedentes de Lima (Huaral).	41
TABLA 7	Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> procedentes de Ica.	42
TABLA 8	Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> procedentes de Cuzco.	43
TABLA 9	Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> procedentes de Cajamarca.	44
TABLA 10	Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> procedentes de Arequipa.	44
TABLA 11	Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> procedentes de Tacna.	44
TABLA 12	Resumen de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en cepas de <i>B. thuringiensis</i> de diferentes regiones del Perú.	45
TABLA 13	Análisis y características del alineamiento de secuencias de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> .	52
TABLA 14	Bioensayos con cepas de <i>B. thuringiensis</i> evaluadas	54
TABLA 15	Valores estimados de dosis letales de cepa <i>B. thuringiensis</i> HD-500 contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> .	56
TABLA 16	Valores estimados de dosis letales de cepa <i>B. thuringiensis</i> Caj1 contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> .	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1A Esporas y cristales de <i>B. thuringiensis</i> . Tinción con Azul Brillante de Coomasie.	31
Figura 1B Microfotografías de esporas de <i>B. thuringiensis</i> observados por Tinción con verde de malaquita.	31
Figura 2 Perfil de proteínas de cepas de <i>B. thuringiensis</i> por SDS-PAGE.	33
Figura 3 Análisis de diversidad de cepas según REP-REP.	35
Figura 4 Similitud genética entre cepas nativas de <i>B.thuringiensis</i> y estándares.	37
Figura 5a Electroforesis en agarosa 1% de los amplificados PCR con primer universal <i>cry1</i>	46
Figura 5b Electroforesis en agarosa 1% de los amplificados PCR con primer universal <i>cry 2</i>	46
Figura 5c Electroforesis en agarosa 1% de los amplificados PCR con primer universal <i>cyt 1</i>	47
Figura 5d Electroforesis en agarosa 1% de los amplificados PCR con primer universal <i>cry 4</i> .	47
Figura 5e Electroforesis en agarosa 1% de los amplificados PCR con primer universal <i>cry 2</i> , de cepas estándar.	48
Figura 6a Electroferograma de las secuencias parciales del gen <i>cry2</i> de Ica10.	50
Figura 6b Electroferograma de las secuencias del gen <i>cyt2</i> de HD-500.	50
Figura 7 Análisis de secuenciamento (Alineamientos).	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
bp	Pares de bases
°C	Grados Centígrados o Grados Celsius
Cry	Proteína formadora de cristal (del inglés Crystal protein)
<i>cry</i>	Genes <i>cry</i>
Cyt	Proteína citolítica (del inglés Cytolytic protein)
<i>cyt</i>	Genes <i>cyt</i>
DNA	Acido Desoxiribonucleico
DO	Densidad Óptica
dNTP	Desoxyribonucleotido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente
EEUU	Estados Unidos de Norteamérica
EXO	Exonuclease I
g	Gramos
h	Hora
INS	Instituto Nacional de salud
kb	Kilo base
LB	Luria Bertani
M	Molar
Mb	Mega base
mM	Milimolar

min	Minutos
MINSA	Ministerio de Salud
mL	Mililitros
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEMBA	Agar yema de huevo, manitol y polimixina B
pH	Potencial de hidrógenos
RFLP	Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción
REP	Polimorfismo de Elementos Repetitivos
rpm	Revoluciones por minute
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SB	Sporulation Broth (Caldo de esporulación).
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
U	Unidad
ug	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
UV	Ultravioleta
vol	Volúmenes

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) es una bacteria Gram positiva que forma un cristal paraesporal con actividad insecticida contra insectos de diferentes órdenes. Los bioinsecticidas fabricados con las esporas y cristales de *B. thuringiensis* son una alternativa frente a los pesticidas químicos sintéticos para el control de mosquitos que son vectores de enfermedades metaxénicas, como por ejemplo, malaria y dengue.

Se caracterizaron 53 cepas nativas de *B. thuringiensis*, procedentes de suelos peruanos, de los departamentos de Junín, Lima (Huaral), Ica, Cuzco, Tacna, Arequipa, Chiclayo y Cajamarca; dos de ellas codificadas como Ica10 y Caj1 por su procedencia, presentaron actividad entomocida contra larvas de *Aedes aegypti*. Se observan cepas que presentan bandas (toxinas) con pesos moleculares en el orden de los 36 kDa y mayores a 116 kDa; otras cepas presentan bandas a 97 y 75 kDa, como las de, Cajamarca, Arequipa y Chiclayo, que serían entomocidas para dípteros, algunas cepas presentaron bandas de 130 kDa que corresponderían al *gen cry1*, tóxico para lepidópteros.

El *gen cry2* fue el más frecuente (92%), seguido de *cry1* (45%) y *cry4* (42%), lo cual significaría que las cepas tendrían principalmente, actividad entomocida contra dípteros. El secuenciamiento confirmó la presencia de genes *cry* en 62 de 67 cepas analizadas. Se determinó la cepa *B. thuringiensis* Cuz5 como variedad *cry2Ab*.

El método del PCR fue efectivo para caracterizar rápidamente las cepas en base al contenido de genes que amplifican con secuencias de oligonucleótidos conocidos. El método REP-PCR mostró patrones de bandas diferentes en las cepas aisladas que podría significar variabilidad genética entre las cepas estudiadas, el dendograma permitió agruparlas en tres clusters y subclusters que podrían deberse a las variedades del *gen cry*.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, cristal paraesporal, entomocida, *gen cry*, control de plagas.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*), is a Gram-positive bacterium, that forms a parasporal crystals with insecticidal activity against different insect orders. Bioinsecticides manufactured with *B. thuringiensis* spores and crystals are a useful alternative to synthetic chemical pesticide in agriculture and for mosquito control. *B. thuringiensis* has also been used successfully to suppress the population levels of medically important dipteran pests. Examples include the mosquito vectors of malaria, virus diseases including dengue.

It was characterized 53 strains peruanas of *Bacillus thuringiensis* with entomocidal properties from soil Peruvian's farms of the departments of Junín, Lima (Huaral), Ica, Cuzco, Tacna, Arequipa, Chiclayo y Cajamarca, two: Ica10 y Caj1 with activity against *Aedes aegypti*. There are strains with toxins between 36 y 116kDa. Strains with bands to 97 and 70KDa, as those of Arequipa, Cajamarca and Chiclayo, which would be entomocidal with band of 130 kDa that correspond to cry gen, toxic to Lepidoptera and Diptera.

Cry2 gene was the most abundant (92%), followed by *cry1* (45%) and *cry 4* (42%), which means that the strains would have activity against Dipterans. The sequencing confirms the content of *cry* genes in most of the analyzed strains. The strain Cuz5 as variety *cries 2Ab*.

The PCR method is effective to rapidly characterize the strains based on the content of genes that amplify with known sequences of oligonucleótidos and REP-PCR shows patterns of different bands in the isolated strains that could mean genetic variability among the studied strains, the dendogram allows to group them into three clusters and subclusters, that might be due to the varieties of the gene *cry*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, parasporal crystal, entomocida, *cry* gene, crop pestes.

I. INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) es una bacteria Gram positiva, aeróbica de la familia Bacillaceae, muy semejante a *B. cereus* y *B. anthracis* (Radnedge *et al.*, 2003), se caracteriza por la producción de una inclusión paraesporal de origen proteico o δ -endotoxina durante la fase de esporulación, responsable del efecto insecticida que se produce cuando son ingeridas por larvas de insectos de diferentes órdenes, tales como Lepidóptera (polillas y mariposas), Diptera (moscas y mosquitos), Coleoptera (escarabajos) e Himenoptera (abejas y avispas), en menor medida son afectados los órdenes Homoptera (cigarras, pulgones y cochinillas) y Mallophaga (piojos) (Schnepf *et al.*, 1998), incluso afecta otros invertebrados como Platyhelminthes, Sarcomastigophora, (Feitelson *et al.*, 1992) y Nematoda (Al-Banna & Khyami-Horani, 2004), mientras que en los mamíferos no se ha comprobado efecto alguno (Cerón *et al.*, 1995; Ibarra *et al.*, 2003; Maduell *et al.*, 2007). La actividad tóxica, se extiende a protozoarios, trematodos, ácaros, colémbolos y lombrices de tierra, entre otros de interés agrícola (Velasco, 2010).

Los insecticidas químicos han demostrado ser tóxicos para el hombre y otros organismos, han creado resistencia en los vectores (Soberón *et al.*, 2007), y provocado trastornos ecológicos irreversibles por su efecto acumulativo (Castro *et al.*, 1996, 1999; Cetinkaya, 2002), debido a su lenta degradación y falta de especificidad. Por ello surgió el interés en estudiar a *B. thuringiensis*, ésta posee una toxicidad selectiva alta debido a su estrecho rango de especificidad y gracias a ello genera en el ambiente un impacto muy bajo (Sauka & Benintende, 2008).

El uso de *B. thuringiensis* como biolarvicida, es una alternativa viable para el control de insectos plaga, es así que se *ha* realizado la caracterización de cepas aisladas de diferentes regiones de Cuba, la cual se basó en la actividad insecticida contra *Drosophila melanogaster* (Carrera & Rodríguez, 2009).

Desde el descubrimiento de *B. thuringiensis* como agente bioinsecticida, la lucha contra los mosquitos vectores ha sido reconocida por la OMS (1998) como la mejor medida de control de enfermedades metaxénicas. Asimismo se han realizado diversos estudios, tales como, bioensayos de toxicidad (Ochoa *et al.*, 2009), evaluación de genes asociados a la toxicidad en insectos, hallazgo de nuevos genes *cry*, con la idea de preparar nuevas formulaciones efectivas en el manejo integrado de plagas (Cámara *et al.*, 2009).

El Perú es uno de los 7 países con mayor diversidad biológica del mundo, es una zona endémica de enfermedades metaxénicas como fiebre amarilla, malaria, dengue. El dengue, es la enfermedad viral humana más importante en salud pública, transmitida por mosquitos del género *Aedes* principalmente *A. aegypti*. Ésta se ha ido extendiendo a varios países, en especial a los de las regiones tropicales y subtropicales por lo que se le considera como una de las principales enfermedades reemergentes y emergentes a escala mundial.

En nuestro país (Flores *et al.*, 2010) y en otros del continente, como en México (Delgado, 2011), Argentina (Guerchicoff *et al.*, 1997), se ha descrito el potencial mosquitocida (Agaisse & Lereclus, 1995) de cepas de *B. thuringiensis* aislados de diversos agroecosistemas, han estandarizado medios de cultivo para su producción y evaluado su actividad biolarvívica (Ventosilla *et al.*, 2001, 2005).

Es importante el control de insectos plaga que dañan nuestra agricultura, explorar la presencia y diversidad de cepas de *B. thuringiensis*, caracterizarlas molecularmente para utilizarlas como fuentes de nuevos genes *cry*, lo cual proporcionará información sobre los patrones de distribución ecológicos de la bacteria y la oportunidad de seleccionar cepas para elaborar bioinsecticidas para controlar diversas plagas y vectores de enfermedades metaxénicas, debido al impacto económico que muchas plagas ocasionan a ciertas plantaciones y a la economía del país y por los problemas de salud que significan muchas enfermedades relacionadas con vectores.

Por ello, el objetivo del presente trabajo, fue la caracterización molecular de genes *cry* genómico y plasmidial de cepas nativas de *B. thuringiensis* aisladas de diferentes regiones del Perú, (utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR) y evaluar su toxicidad por medio del bioensayo en larvas de mosquitos del género *Aedes*, dada su prevalencia en nuestro medio, con la idea de plantear a las autoridades respectivas el control de plagas y vectores mediante el uso de *B. thuringiensis* como bioinsecticida.

II. ANTECEDENTES

2.1. Historia

A la fecha se conoce un gran número de organismos patógenos de insectos de donde sobresalen virus, bacterias, hongos, protozoarios, nemátodos, entre otros; lo cuales varían en su modo de infección, sitio y mecanismo de acción, así como en su preferencia hacia sus diferentes blancos específicos. A todo este grupo de organismos se les denomina entomopatógenos (Velasco, 2010).

El primer caso de utilización exitosa de las bacterias como entomopatógenas, fue la introducción del *Bacillus popilliae* y *B. lentimorbus* contra el escarabajo japonés *Popillia japonica* en los Estados Unidos. Estos gérmenes causan la “Enfermedad lechosa” de las larvas del escarabajo. Actualmente existen preparadas formulaciones comerciales de *B. popilliae*: Doom, Grub Attack, Milky Spore Powder y Japidemic, que se aplican contra diversos escarábidos. Ningún patógeno ha recibido tanta atención como el *B. thuringiensis* Berliner. Después de perfeccionarse los métodos de cultivo y desarrollarse diversas razas biológicas este patógeno se ha comercializado bajo diferentes formulaciones de polvos, aspersiones y gránulos con diversos nombres comerciales (Carrera & Rodríguez, 2009).

B. thuringiensis var. *thuringiensis* fue aislada por primera vez en 1901 en Japón por el bacteriólogo Shigetane Ishiwata, a partir de larvas muertas del gusano de seda *Bombyx mory* (lepidóptero), que presentaba la enfermedad del sotto, pero fue descrita y nombrada en 1911, por Ernst Berliner quien la aisló de larvas enfermas del lepidóptero *Anagasta Kuehniella*, la “palomilla de la flor del Mediterráneo” en la provincia de Thuringia, Alemania. Berliner fue el primero que describió la presencia de un cuerpo de inclusión o cristal, considerada una característica fenotípica que permite diferenciar a *B. thuringiensis* de otras especies de *Bacillus* (Maduell, 2007).

Aunque la bacteria se utilizó en forma limitada como agente de control de plagas a finales de los 20 y principios de los 30, ésta fue relegada, primero por el surgimiento de la segunda guerra mundial y luego por el advenimiento de los insecticidas químicos. No fue sino hasta los años 50 en que Edward Steinhaus reinició su estudio, comprobando su gran potencial como agente de control de plagas, y promoviendo su desarrollo industrial y comercial como bioinsecticida. Para 1959 ya existía en el mercado un producto a base de esta bacteria y desde entonces estos productos se han diversificado ampliamente, llegando a constituir cerca del 5% del consumo de insecticidas en el mundo.

B. thuringiensis fue utilizado por primera vez en 1938, como insecticida comercial en Francia. En 1956, se describe que la actividad insecticida contra lepidópteros se debía a la presencia de inclusiones cristalinas paraesporales de naturaleza proteica. En 1961 se registra como biopesticida en la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) en EEUU, y la misma Agencia en el año 1993 la designó como estándar de potencia o unidad internacional de toxicidad.

En 1970, Dulmage descubrió la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* en EEUU a partir de larvas enfermas de lepidópteros. Esta variedad resultó ser entre 2 y 200 veces más tóxica que las antes utilizadas como bioinsecticidas. En 1977, aislaron un bacilo a partir de larvas del mosquito *Culex sp.*, el cual se denominó *B. thuringiensis* variedad *israelensis*, y fue considerado útil en salud pública para el control de vectores de enfermedades tropicales por ser patógeno de larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), vector del dengue (Maduell, 2007).

En 1981 se clonó el primer gen que codificaba un cristal proteico de *B. thuringiensis* (Díaz, 2006). En 1983, fueron descritas *B. thuringiensis* variedad *tenebrionis*, *B. thuringiensis morrisoni* y *B. thuringiensis* variedad *san diego*, activas contra insectos coleópteros. A partir de entonces aumentó en todo el mundo el interés por esta bacteria; se ha encontrado una gran diversidad, caracterizada por su serotipo flagelar H, es decir por las proteínas presentes en el flagelo (Schnepf *et al.*, 1998), en más de 84 serovariedades diferentes, (Maduell 2007; Sauka & Benintende, 2008).

Muchas investigaciones han realizado la identificación, el aislamiento y la caracterización de cepas de *B. thuringiensis* (Hodgman *et al.*, 1993; Ceron *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 1998; Valadares *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2002; Carmona, 2002; Sauka *et al.*, 2005; Gillis & Santana 2007; Hercos & Gomes De Paula, 2008; Baró *et al.*, 2009), se ha descrito la presencia de más de 200 genes *cry*, Armengol *et al.*, (2007), se han clonado, secuenciado y estudiado su diversidad genética, también se han manipulado los genes para producir plantas transgénicas resistentes a insectos plaga (Llewellyn *et al.*, 1994; Brookes & Barfoot, 2006; Kumar *et al.*, 2008; Alphey *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012).

Ha crecido el interés en esta extraordinaria bacteria para ampliar su uso, no sólo como bioinsecticida sino también como una maquinaria para la producción de enzimas u otras proteínas (quitinasas, péptidos antimicrobianos), con potencial uso aplicativo en la industria alimentaria. Entre la gran diversidad de metabolitos que produce *B. thuringiensis*, destacan bacteriocinas, antibióticos y enzimas extracelulares (como proteasas y quitinasas) elementos clave en el fenómeno de supresión de patógenos (Carreras, 2011).

2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

B. thuringiensis es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta (Soberón y Bravo, 2007), de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho, posee como característica distintiva la capacidad de sintetizar y acumular proteínas denominadas Cry y depositarlas como cristales paraesporales durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento y de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (Schnepf *et al.*, 1998). Es un microorganismo quimioorganotrofo y con actividad de catalasa, las distintas cepas de *B. thuringiensis* poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina (Sauka & Benintende, 2008).

Durante su ciclo de vida presenta dos fases diferenciadas, la fase de crecimiento vegetativo en la cual las bacterias se duplican por bipartición y la

fase de esporulación que se desencadena cuando la bacteria se encuentra en un medio con limitación de nutrientes; el proceso de formación de la espora se puede dividir en siete fases: en la fase I se inducen los genes que darán inicio a la esporulación, la adición de nutrientes en esta fase puede revertir el proceso; en la fase II se forma un septo de división asimétrico, a partir de esta fase el proceso es irreversible; en la fase III, se inicia la síntesis del cristal y continuará su maduración hasta el final de la esporulación. La síntesis del cristal se da a partir de dos promotores que funcionan secuencialmente (BTI y BTII). El primero es reconocido por σ^A durante las fases III y IV y el segundo por σ^K durante las fases V y VI. Durante estos pasos ocurre conjuntamente la formación de la espora. Finalmente en la fase VII se sintetizan enzimas líticas que liberan a las esporas y los cristales del compartimento (Bechtell & Bulla, 1976). La fase de esporulación se caracteriza por la formación de cristales o cuerpos paraesporales intracelulares de naturaleza proteica a los cuales se les ha denominado proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998), estas proteínas cristal que presentan actividad insecticida, están codificadas por genes *cry* localizados en plásmidos (Vitelli, 2010; Gonzales *et al.*, 2011).

Las proteínas Cry de los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* son protoxinas que cuando son ingeridas por las larvas de los insectos susceptibles, les causan intoxicación. Las condiciones alcalinas del intestino medio de la larva y su procesamiento proteolítico, catalizado por diferentes proteasas de la larva (tripsina y quimiotripsina) disuelven los cristales y activan las protoxinas convirtiéndolas en toxinas. La toxina activa es conocida como δ -endotoxina, la cual se une a receptores específicos presentes en las células del epitelio intestinal del insecto hospedero (aminopeptidasa y caderinas) formando poros o canales iónicos en la membrana (Aronson & Shai, 2001; Aronson, 2002). Esto provoca la lisis osmótica que conduce a la parálisis y muerte, por inanición, de la larva.

B. thuringiensis es considerado una bacteria cosmopolita en el ambiente, distribuida ampliamente en todo el mundo debido a su capacidad esporulante, lo que le confiere una elevada resistencia al calor y a la sequedad, se le ha aislado de diversos ecosistemas como suelos, agua, hojas de plantas,

granos almacenados, insectos muertos, telarañas, y otros, la obtención de cepas a partir de cadáveres de insectos ha sido la principal fuente de preparados de uso comercial (Iriarte & Caballero, 2001).

B. thuringiensis, morfológicamente está muy estrechamente relacionada con *B. cereus* y *B. anthracis* (Helgason *et al.*, 2000) con las cuales presenta características bioquímicas comunes; sin embargo el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (2001), reconoce la individualidad de *B. thuringiensis* basándose en dos de sus características particulares, la producción de proteínas cristalíferas durante el proceso de esporulación y su capacidad insecticida. Sin embargo, se ha publicado que puede haber transferencia de genes entre especies relacionadas (*B. cereus*, *B. anthracis* y *B. mycoides*) por conjugación y estas pueden expresar la toxina y producir la proteína cristal (Hu *et al.*, 2004). También, se ha observado que *B. thuringiensis* es capaz de producir la enterotoxina de *B. cereus*, lo que sugiere la transferencia conjugativa de genes de *B. cereus* a *B. thuringiensis* (Carlson & Kolsto, 1993).

Las proteínas tóxicas para lepidópteros pertenecen a los grupos Cry1 y Cry9, las toxinas activas contra coleópteros son las proteínas Cry3, Cry7 y Cry8. Proteínas tóxicas contra nemátodos son Cry5, Cry12, Cry13, Cry14, y contra dípteros son Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19, y proteínas Cyt. El grupo de proteínas Cry2 son activas tanto para dípteros como para lepidópteros. También los subgrupos Cry1B y Cry1I tienen actividad dual contra lepidópteros y coleópteros (Bravo *et al.*, 1998), (Carrera *et al.*, 2004).

La principal actividad insecticida contenida en este bacilo son las inclusiones cristalinas paraesporales producidas durante la esporulación, sin embargo otras toxinas también contribuyen al efecto biológico final, como el producido por las proteínas insecticidas vegetativas o proteínas VIP, expresadas y secretadas durante el desarrollo vegetativo y la esporulación, estas fueron descritas como tóxicas para lepidópteros (Estruch *et al.*, 1996). Además una serie de compuestos extracelulares contribuyen a su virulencia: β -exotoxinas, fosfolipasas, proteasas y quitinasas. Las esporas pueden contribuir

a la patogenicidad, a menudo sinergizando la actividad de las proteínas cristal (Schnepf *et al.*, 1998).

Las delta (δ) endotoxinas conocidas hasta el momento se dividen en dos categorías Cry y Cyt que no comparten similitud de secuencia significativa aunque ambas actúan a través de la formación de poros que conducen a la lisis celular y daño irreversible del intestino medio del insecto. Mientras que las toxinas Cry (cristal) actúan a través del reconocimiento y unión a receptores específicos, las Cyt (citólíticas) no usan receptores, aunque muestran especificidad de acción en vivo (Guerchicoff *et al.*, 2001).

Existe evidencia que las proteínas Cry y Cyt interactuarían en específica combinación sinérgica en el intestino del insecto para ejercer su efecto biológico final. Los genes *cyt* estarían ampliamente distribuidos entre subespecies de *B. thuringiensis* y constituirían otra familia de genes altamente relacionados (Guerchicoff *et al.*, 2001). Se ha descrito, más de 100 genes *cry* que codifican proteínas Cry. Estas constituyen una familia diversa de proteínas insecticidas con diferentes blancos de acción: insectos, nemátodos, ácaros y protozoarios. Los genes *cyt* presentes en *B. thuringiensis* codifican proteínas Cyt con actividad citolítica y hemolítica, se ha encontrado que la subespecie *B. thuringiensis israelensis* tiene dos tipos de toxinas Cyt1A y Cyt2B. La toxina Cyt 1A habría sido la primera toxina citolítica aislada y completamente caracterizada, además de ser el principal componente del cristal tóxico para esta subespecie.

La gran diversidad de combinaciones de genes de δ -endotoxinas existentes se debe principalmente a que éstos están situados principalmente en plásmidos transmisibles por conjugación entre cepas y su secuencia está frecuentemente flanqueada de elementos transponibles, lo que posibilita su transmisión horizontal.

B. thuringiensis es una fuente valiosa de proteínas tóxicas Cry y Cyt, que son inofensivas para mamíferos, pero se ha reportado una proteína obtenida a partir de *B. thuringiensis* cepa A1547, denominada parasporina -2, que no es

insecticida pero que tiene una fuerte actividad citocida particularmente contra células de carcinoma humano, se distingue de las Cry por no ser insecticida y también de las Cyt por carecer de actividad hemolítica, este grupo puede tener potencial para aplicaciones médicas, tal como el tratamiento del cáncer (Akiba *et al.*, 2004).

B. thuringiensis tiene una gran variedad de cepas con diferente potencial tóxico de acuerdo a las regiones donde son aisladas (Thomas *et al.*, 2001). Existen colecciones de cepas de *B. thuringiensis* en diferentes partes del mundo, tales como: La Antártida, China, Colombia, Japón, México (Bravo *et al.*, 1998), Filipinas, España (Ruiz De Escudero *et al.*, 2004), Taiwan, Reino Unido, Estados Unidos de Norteamérica y algunos países Asiáticos (Ben-Dov *et al.*, 1997). Estas colecciones tienen gran importancia para analizar la distribución de toxinas producidas por las cepas en la naturaleza y evaluar su potencial tóxico contra diferentes órdenes de insectos. Sin embargo también puede ayudar a entender el rol de *B. thuringiensis* en el medio ambiente (Apaydin, 2004).

2.3 CRISTALES PARAESPORALES

Desde el instante en el que ocurre el englobamiento de la pre-espora hasta su maduración; simultánea a la formación de la espora, *B. thuringiensis* sintetiza una o varias inclusiones cristalinas que pueden representar hasta un 30% del peso seco del esporangio (Kronstad, 1983) y que son fácilmente observables bajo microscopio de contraste de fase. Este cristal está separado de la endospora y es liberado cuando la pared celular se autolisa al final de la esporulación (Sauka & Benintende, 2008, Ibarra, 2003).

Cada cuerpo de inclusión puede estar constituido por proteínas Cry de una o varias clases que se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro. La estabilidad de estas uniones condiciona el pH de solubilización del cristal. Particularmente en el caso de los cristales bipiramidales, cuando estos puentes están distorsionados, estos cristales son solubles a pH mayor de 9,5; mientras que si permanecen en su estado más estable necesitan un pH superior a 12

para lograr su solubilidad, (Sauka & Benintende, 2008). La estructura de esta inclusión es el resultado del ensamblaje de varias unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, que oscilan entre 27 y 140 kDa, las cuales le dan su forma característica (Hofte & Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998).

Las cepas de *B. thuringiensis* pueden presentar cristales con distintas morfologías y pueden clasificarse en bipiramidales, relacionado con Cry1; cúbicos, asociados con Cry2; cuadrados aplanados, típicos de Cry3; esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes, relacionadas con Cry4 y Cyt; en forma de barra, relacionada con Cry4D (López-Meza & Ibarra, 1996; Schnepf *et al.*, 1998).

Se logró en muchos casos establecer relación entre la forma del cristal, sus proteínas Cry constituyentes, el peso molecular de éstas y su espectro de actividad insecticida. Sin embargo, existen trabajos en los que se describieron cristales parasporales que, a pesar de tener morfologías asociadas a una toxicidad específica, no parecen poseer actividad insecticida alguna. El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la spora, y ambos son finalmente liberados tras la lisis celular. Existen algunos casos donde se describieron cristales dentro del exosporio, por lo que estos continúan junto a las esporas tras la lisis. En otro caso muy atípico, se pudo observar que los cristales se forman fuera del exosporio, pero ambos permanecen indefinidamente dentro de un esporangio que no se lisa, preservándolos de una rápida degradación.

Las diferentes toxinas producidas por *B. thuringiensis* reconocidas actualmente son, la α -exotoxina o fosfolipasa Ct, la exotoxina, una toxina lábil, una toxina soluble en agua, la exotoxina factor ratón, la β -exotoxina y la δ -exotoxina, de las cuales las dos últimas son las más estudiadas por su acción tóxica contra larvas de insectos (Velasco, 2010).

Los cristales paraesporales son ampliamente utilizados para la elaboración de bioinsecticidas, lo que ha motivado el estudio y la búsqueda de proteínas Cry. Esto ha permitido establecer la existencia de más de 200 proteínas Cry.

La inclusión de una nueva proteína Cry en este grupo depende del cumplimiento de algunas características, tal como su acumulación en la célula mediante un cristal paraesporal y el presentar similitud a nivel de secuencia de aminoácidos con alguna de las proteínas Cry existentes; además de contar con actividad tóxica frente a algún organismo (Crickmore *et al.*, 1998).

Las proteínas Cry pueden agruparse dentro de distintos grupos de homología, ellas poseen tres dominios altamente conservados; el dominio I ha sido implicado en la formación del poro mediante la inserción de sus α - hélices en la membrana de las células epiteliales; el dominio II juega un papel importante en la interacción con el receptor membranal y es el responsable de la toxicidad específica; el dominio III está involucrado en la unión al receptor y adicionalmente tiene un rol en la formación del poro. Por otra parte, existen grupos de homología minoritarios formados por proteínas que se depositan como cristales en la bacteria, pero carecen de los tres dominios conservados de las proteínas Cry. Adicionalmente, existen proteínas que se depositan como inclusiones cristalinas en la bacteria, pero carecen de actividad tóxica, motivo por el cual no son consideradas del grupo de proteínas Cry (Loeza *et al.*, 2005).

2.4 MECANISMO DE ACCIÓN

El modo de acción de las toxinas Cry fue descrito en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Las proteínas cristal son sintetizadas como protoxinas las cuales son liberadas luego de ser ingeridas por larvas susceptibles y solubilizadas en el medio alcalino (pH 10-12) del intestino medio de la larva del insecto. Estas deberán ser cortadas en sitios específicos por proteasas intestinales para generar fragmentos de toxinas activas resistentes a proteasas, de 60-70 kDa que causaran la muerte de la larva (Gómez *et al.*, 2001; Sauka *et al.*, 2008).

Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial. Luego, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, se inicia una cascada de señalización

dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular. Además, el inicio de esa cascada de señalización estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula y aumenta el número de receptores; por ende, recluta un número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial.

Además se ha propuesto en base a experimentos en vivo y bioensayos, que la unión de los monómeros a caderina facilita la hidrólisis proteolítica sobre el extremo N-terminal de la toxina. Este último clivaje induce el ensamble de los monómeros y se establece una forma oligomérica pre-poro. Esta estructura incrementa la afinidad por un receptor secundario como puede ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina. Por último, la unión a ese segundo receptor facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio, esto provoca un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular. Resultando dañado gravemente el tejido intestinal, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva lo que la lleva a la muerte. La muerte puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele del insecto (Sauka & Benintende, 2008).

Autores como Broderick et al., (2006) descartaron estas posibilidades y demostraron que la mortalidad inducida por *B. thuringiensis* dependería en esencia de ciertas bacterias entéricas que son parte de la microbiota normal del intestino del insecto susceptible, ya que sólo *B. thuringiensis* no sería suficiente. Estas bacterias serían responsables de causar la septicemia en el insecto luego de que *B. thuringiensis* les permite alcanzar el hemocele tras dañar el epitelio intestinal.

2.5 FACTORES GENÉTICOS DE *Bacillus thuringiensis*

2.5.1 GENOMA DE *Bacillus thuringiensis*

Las cepas de *B. thuringiensis* tienen un genoma de 2.4 Mb a 5.4-6.3 Mb (Carlson et al., 1994). La comparación del genoma de *B. thuringiensis* con el mapa cromosomal de *B. cereus* ha demostrado que los cromosomas tienen

una organización similar en la mitad cerca al origen de replicación mientras que presentan mayor variabilidad en la otra mitad terminal (Carlson & Kolsto, 1993). La mayoría de cepas de *B. thuringiensis* exhiben usualmente un complejo perfil de plásmidos circulares y lineales cuyos tamaños varían desde 2 hasta más de 200 kb (Loeza-Lara, 2005). Los genes *cry* que codifican las toxinas Cry están principalmente localizados en grandes plásmidos conjugativos (Li *et al.*, 1991, Loeza-Lara, 2005). Existe la idea generalizada de que los genes *cry* siempre se localizan en plásmidos de alto peso molecular, generalmente con un tamaño superior a 30 kb y con replicación tipo theta. Sin embargo algunos autores los han descrito de bajo peso molecular y también han reportado la existencia de genes *cry* insertados en el cromosoma de *B. thuringiensis*, (Carlson *et al.*, 1994; Sauka & Benintende, 2008). Schnepf *et al.*, (1998) menciona que no se ha reportado la presencia de genes *cry* en plásmidos pequeños menores de 15 kb.

Las especies y subespecies de *B. thuringiensis* contienen una gran variedad de elementos transponibles, que incluyen secuencias de inserción y transposones, esta característica provee un medio importante para la movilización de toxinas y para el ensamblaje de nuevas combinaciones de genes *cry* en cepas de *B. thuringiensis*. Se ha postulado que participarían en la amplificación de genes *cry* en la célula, o de mediadores de la transferencia de plásmidos (Schnepf *et al.*, 1998).

Se ha determinado la secuencia de diez plásmidos RC menores a 15 kb en *B. thuringiensis*; estos han sido considerados como crípticos, debido a que no se les ha atribuido ninguna función para la bacteria, solamente se han encontrado funciones relacionadas con la replicación y movilización de ADN. La reducida información que existe sobre los plásmidos RC en *B. thuringiensis* contrasta con la extensa información que existe sobre los genes *cry* y las proteínas (Loeza-Lara, 2005).

2.5.2 GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS INSECTICIDAS Cry

Muchos genes *cry* han sido clonados y secuenciados. Existen 376 genes *cry* distintos que se clasificaron sobre la base de su similitud de secuencias en 54 grupos divididos en diferentes clases y subclases. Una lista actualizada de todos estos genes *cry*, cuyo número aumenta día a día, se encuentra disponible con acceso libre en Internet. Muchas cepas de *B. thuringiensis* pueden contener múltiples genes *cry* a menudo flanqueados por transposones o secuencias de inserción, motivo por el cual las cepas pueden sintetizar más de una proteína cristal. Esta diversidad es debida a la transferencia de plásmidos entre cepas de *B. thuringiensis* (Thomas *et al.*, 2001).

Los genes *cry* poseen una secuencia codificante de alrededor de 1900 pb (*cry2Ab*) y unos 3600 pb (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, etc.) (Crickmore, 1998). Las proteínas que codifican presentan una identidad aminoacídica que puede variar desde más de un 90% hasta menos de un 20%, y el intervalo de masas moleculares oscila entre 50 y 140 kDa. Las cepas de *B. thuringiensis* pueden portar un único gen *cry*, como por ejemplo *B. thuringiensis serovariedad Kurstaki* HD-73, que posee solamente un gen *cry1Ac*; o bien presentar perfiles génicos muy complejos, con hasta ocho genes *cry* diferentes.

En general, es posible correlacionar el tipo de gen *cry* presente en una determinada cepa o aislamiento con su actividad insecticida. Por lo tanto, la identificación del contenido génico *cry* de una cepa de *B. thuringiensis* puede utilizarse para efectuar dicha predicción (Sauka & Benintende, 2008).

III. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron:

OBJETIVO GENERAL

- La caracterización molecular de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades entomocidas contra vectores de enfermedades que afectan la salud del hombre, como el Dengue, para ello se han elaborado los siguientes objetivos específicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar proteínas de *Bacillus thuringiensis*.
2. Caracterizar mediante identificación molecular de los genes *cry* y *cyt*.
3. Demostrar diferencias en contenido de genes *cry* y *cyt* en cepas nativas de *B. thuringiensis*.
4. Ensayar preliminarmente la biotoxicidad de *B. thuringiensis* contra *Aedes aegypti*, vector del Dengue.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Cepas nativas de *B. thuringiensis*

Se utilizaron 57 cepas nativas de *B. thuringiensis* provenientes de muestras de rizósfera de cultivos de importancia económica de los departamentos de Arequipa, Cajamarca, Chiclayo, Lambayeque, Cuzco, Lima (Huaral), Ica, Junín y Tacna, pertenecientes a la colección de cepas del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM y proporcionadas por el Dr. Abad Flores Paucarima (Tabla 1B) (Tabla 12). Las cepas de Chiclayo y Lambayeque se perdieron, la Fig. 2 muestra el patrón de proteínas de la cepa de Chiclayo; Las 55 cepas que quedaron fueron usadas para identificar los genes *cry* y *cyt* y 53 se utilizaron para evaluar las secuencias REP (no se usaron las cepas Jun14 y Tac1), sólo 36 cepas fueron utilizadas para los bioensayos.

4.1.2. Cepas referenciales de *Bacillus thuringiensis*

Las 10 cepas estándar de referencia usadas en este estudio (*B. thuringiensis israelensis* HD-500, *B. thuringiensis aisawai* HD-130, *B. thuringiensis Monterrey* GM33, *B. thuringiensis israelensis* WHO-2013-9, *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis kurstaki* HD-2, *B. thuringiensis kurstaki* HD-73, *B. thuringiensis israelensis* HD-968, *B. thuringiensis kurstaki* HD-263, *B. thuringiensis kurstaki* 732) fueron preparaciones liofilizadas de la colección de la Northern Regional Laboratory (NRRL) Peoria-Illinois-USA, proporcionadas por el Ph.D. Alejandro P. Rooney de Microbiological Genomics and Bioprocessing Research Unit de USDA (United States Department of Agriculture) al laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM y que aparecen listadas en la Tabla 1A. La cepa *B. thuringiensis kurstaki* 732 solo se uso para amplificar las secuencias REP.

4.1.3. Larvas de *Aedes aegypti*

Las larvas del III estadio de *Aedes aegypti* fueron obtenidas en el laboratorio a partir de la eclosión de huevos procedentes de las ciudades de Trujillo y Chulucanas, los cuales fueron proporcionados por la Dra. Rosario Balta del Departamento de Entomología del Instituto Nacional de Salud.

4.2 Materiales

Los medios de cultivo bacteriológicos, usados en el presente trabajo fueron de grado analítico (Merck). Los reactivos de electroforesis en gel (PAGE-SDS) de grado analítico, fueron obtenidos de la casa Sigma-Aldrich. Los reactivos para PCR, fueron grado biología molecular, de las casas Invitrogen[®], Promega[®], Fermentas[®], Aplichem[®]. Los *primers* u oligonucleótidos generales fueron sintetizados por Bio Synthesis. Las sales y otros fueron de grado analítico.

4.3 MÉTODOS

4.3.1. Reconocimiento de cuerpos paraesporales en *B. thuringiensis* nativos

Para confirmar la identidad de *B. thuringiensis* se identifica la presencia del cristal paraesporal típico, para lo cual se utilizó un microscopio de contraste de fase con 1250X de aumento (Nikon E-400, Tokio, Japón), del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología. Las cepas que crecieron en el medio PEMBA (Polimixina B, Manitol y Yema de huevo) y que presentaban características morfológicas similares a *B. thuringiensis*, se cultivaron aisladamente en un agar nutritivo hasta su autólisis a una temperatura de 28°C. El cultivo autolizado fue disuelto en agua destilada estéril y se preparó un frotis delgado sobre una lámina portaobjeto. El material fijado se cubrió con una solución 0,25% de azul de Coomassie R-250 en etanol al 50% y ácido acético al 7% por 10 min; se lavó el exceso de colorante con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Las cepas que contenían cristales paraesporales visibles cerca a la espora en el esporangio, fueron identificados como *Bacillus thuringiensis* (Fig 1A).

Los cultivos aislados fueron luego teñidos con verde de Malaquita para visualizar esporas y cristales, de acuerdo al método de Wirtz – Conklin. (<http://www.bio-nica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>).

Se emplearon cultivos en fase estacionaria para dar lugar a que las bacterias produzcan las esporas. Se prepararon los frotis bacterianos indicados, tiñéndolos con verde de malaquita al 5%, con unas pinzas de madera se colocó las muestras encima de la llama del mechero de forma que el colorante humee, sin que hierva, por 5 min. Se añadió más colorante para evitar que la muestra se seque; se lavó con abundante agua el exceso del colorante, tiñó con safranina 0.5% por 1 min. (Colorante de contraste que tiñe las formas vegetativas), lavó con abundante agua el exceso de colorante, se secó la preparación y observó al microscopio de luz usando aceite de inmersión (Hamouda *et al.*, 2002) (Fig. 1B).

4.3.2 Aislamiento de DNA de cepas nativas y estándar

4.3.2.1 Extracción de DNA genómico de *B thuringiensis*

El DNA genómico presente en cada muestra fue aislado a partir de cepas referenciales y nativas siguiendo el protocolo del Kit comercial de ROCHE (high pure PCR template preparation kit, (Cat. N° 11796 828001), en el laboratorio de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

4.3.2.1.1 Cuantificación del DNA

El DNA así obtenido fue cuantificado usando el espectrofotómetro NANODROP, preparando diluciones a 100ng/μL, también se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% con buffer TBE X (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM; pH 8) a 80V por 30 min. Además se estimó por espectrofotometría su concentración y pureza, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm (longitudes de onda con máximos de absorbancia para ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente), usando buffer TBE como blanco; la

concentración de DNA fue calculada como $\mu\text{g/mL} = \text{DO}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{factor de dilución}$.

4.3.2.2 Aislamiento de DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se realizó de acuerdo a lo reportado por O'Sullivan *et al.*, (1993) con modificaciones que se describen a continuación:

De un cultivo bacteriano en placa de *B thuringiensis* se tomó una azada y se inoculó en un matraz con 50 ml de caldo LB y se incubó a 37°C en agitación constante por 24 horas (o hasta alcanzar la fase logarítmica del cultivo bacteriano), seguidamente:

- a)** 5 mL del cultivo over night se transfirió a tubos de 2mL de capacidad, se precipitó a 14000 rpm por 1 min, se resuspendió el pellet en 150 μL de buffer de lisis I (anexo 1) y homogenizó con un agitador Vortex-Genie 2®, se añadió 4mg/mL de lisozima al buffer de lisis e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
- b).** Después de la incubación se agregó 250 μL de la solución de lisis II (anexo 2), se mezcló por inversión y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se añadió 30 μL de fenol alcalino (anexo 3) y mezcló por agitación.
- c).** Se agregó 200 μL de solución de lisis III (anexo 4) y mezcló por inversión. Las muestras fueron incubadas a -20°C por 20 minutos. Seguidamente centrifugó a 14,000 rpm por 5 min.
- d).** Se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 1.5 ml. Se añadió 400 μl de fenol-cloroformo (anexo 5), mezcló bien y centrifugó a 14000 por 5 min, se colectó la fase superior. Se añadió 800 μl de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C y mezcló por inversión.
- e).** Las muestras fueron llevadas a -70°C por 30 min para que el ADN precipite, fue centrifugado a 14000 rpm por 10 min y el precipitado fue lavado con 250 μl de etanol helado al 70%.
- f).** Se removió el etanol, los tubos se invirtieron para evaporar los restos de etanol a temperatura ambiente. Finalmente se disolvió el ADN plasmídico en 30 μl de agua libre de nucleasas y se agregó una solución de RNAsa, 0.1 mg/mL e incubó a 37°C por 30 min quedando listos para su uso.

El DNA obtenido se analizó por electroforesis en agarosa al 0.8% en buffer TBE X a 80 V por 1h y visualizó en un foto documentador Bio Rad.

Además para determinar su concentración se usó un método cuantitativo con el fluorómetro QUBIT de Invitrogen®.

4.3.3 Obtención del complejo espora-cristal (polvos liofilizados)

Un primer paso para realizar las pruebas de caracterización de proteínas y bioensayos preliminares de actividad toxicológica, fue la preparación adecuada del material. En ambos casos se utilizó polvo liofilizado de la mezcla espora cristal de las cepas de *B. thuringiensis* nativas y estándares activados; estos procedimientos fueron realizados en el Laboratorio de Ácidos Nucleicos del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) de la Facultad de Medicina de la UNMSM.

Para la obtención de los mismos se siguió el método descrito por Carmona (2002) con modificaciones, procediéndose de la siguiente manera: de un cultivo bacteriano se tomó una colonia e inoculó en 50 mL de medio estéril para esporulación (caldo SB) en matraces de 250 mL, e incubó a 30°C con una agitación de 340 rpm por 96 horas o hasta alcanzar la etapa de autólisis (determinada por microscopía). Posteriormente, el complejo espora-cristal se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C, se resuspendió la muestra en NaCl 1,5 M estéril y centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Se realizó este lavado tres veces consecutivas resuspendiendo la muestra cada vez en la solución de NaCl, con el objeto de eliminar las posibles exotoxinas excretadas, los desechos celulares y evitar la posible degradación de las proteínas del cristal insecticida. El precipitado obtenido fue conservado a -20°C hasta su liofilizado para realizar los estudios de análisis de proteínas y bioensayos preliminares.

4.3.4. Análisis de Proteínas

4.3.4.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

El análisis de las proteínas que componen el cristal de las cepas nativas seleccionadas y cepas estándar de *B. thuringiensis*, se realizó en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la UNMSM, mediante electroforesis discontinua en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con tricina dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a la

técnica descrita por Laemli (1970) y Schagger & Von Jagow (1987). Se utilizó para los geles de concentración y de resolución, acrilamida al 4% y 10% respectivamente. A partir de muestra liofilizada conteniendo el complejo espora cristal de las cepas estándar y nativas se prepararon las muestras a ser cargadas en el gel, a una concentración de 2µg/µl, las cuales fueron mezcladas 1:1 con buffer muestra (Tris-HCl 25 mM pH 6.8; β-mercaptoetanol 2,89 mM; SDS 138 M; glicerol 2,17 M) y hervidas por 5 min.

La corrida electroforética se realizó con un buffer Tris-glicina y SDS (Tris-Base 0,05 M, glicina 0,38 M, SDS 0,1%, pH 8,8) a voltaje constante, empleando primero 50V x 40 min y luego se duplicó el voltaje hasta que el colorante marcador llegó al extremo de la placa, lo cual se cumplió a las 3 hs. Finalizada la electroforesis el gel fue fijado en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% por 30 min y se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250, 0.025% (en metanol 40%, ácido acético al 9%) por 20 min. Luego se procedió a su decoloración en una solución de etanol al 5% y ácido acético al 7,5% hasta visualizar las bandas de las proteínas.

4.3.5 Caracterización genotípica de genes *cry* y *cyt* en cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas

4.3.5.1 *Primer* PCR u oligonucleótido cebador

Los siete *primers* usados en este trabajo para la detección de los genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry8*, *cry11*, *cyt1* y *cyt2*, fueron generales (pertenecen a regiones altamente conservadas). La Tabla 2 muestra la secuencia, el tamaño esperado de los productos de la PCR y la temperatura de annealing o hibridización; la secuencia de los primers para los genes *cry1*, *cry8* y *cry11* fueron tomados de las referencias N°40 y 54, y para los genes *cry2*, *cyt1* y *cyt2* se utilizó la referencia N° 54.

4.3.5.2 Amplificación de los genes *cry* y *cyt* por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue realizada en un termociclador (Perkins-Elmer model 480) del CIBN, en otra etapa del trabajo se empleó un termociclador MJ Research PT 100 del INIA y la última parte del análisis de los genes se hizo utilizando un Termociclador Nyx Technik modelo ATC401 del Laboratorio de Química Biorgánica del CIBN. Se siguieron dos protocolos para la detección de genes *cry*.

Primero se siguió el protocolo de PCR descrito en Cerón *et al.*, (1995); Bravo *et al.*, (1998); Carrera *et al.*, (2004) con algunas modificaciones. Las cepas de *B. thuringiensis* fueron crecidas por 13 horas en un caldo Luria LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) para tener un crecimiento muy bajo en fase vegetativa, (previo a la fase de esporulación) donde las colonias presentan una apariencia traslúcida. Se tomó una azada de una colonia y transfirió a un tubo de 1,5 mL conteniendo 0.1 mL de agua ultrapura, la mezcla se congeló a -70°C por 20 min y transfirió a agua hirviendo por 10 min para lisar las células bacterianas. El lisado fue centrifugado por 10 segundos a 14,000 rpm, el sobrenadante se utilizó para el PCR (4µL).

Todas la reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 µL, la mezcla de reacción estuvo constituida por los siguientes componentes: buffer Gold 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótido cebador directo y oligonucleótido cebador reverso o inverso 0.5 µM y 0.5 U/rxn de *Taq* Gold; se usaron 2.0 µL de 50ng/ µL de templado (DNA). Las amplificaciones fueron realizadas en un Termociclador Perkin-Elmer. Se siguió el siguiente programa: desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos, de desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 52°C por 1 min y un paso de extensión a 72°C por 1 min, al final se hace un paso extra de extensión a 72°C por 7 min. La temperatura de annealing (anillamiento o hibridización) varió dependiendo del gen a amplificar (Tabla 3).

Los amplificados o productos de la PCR se visualizaron con el método de electroforesis en gel de poliacrilamida 6% teñidos con tinción de plata o en geles de agarosa al 2% en solución amortiguadora TBE 1X

4.3.5.3 El segundo protocolo estandarizado para la amplificación de genes *cry* y *cyt* de *B. thuringiensis*, utilizó DNA plasmídico purificado

Las amplificaciones fueron realizadas en un Termociclador Nyx Technik modelo ATC401. El programa que se usó fue: Un paso de desnaturalización a 95°C por 5 min seguido de 35 ciclos, de desnaturalización a 95°C por 1 min., hibridación a 52°C por 1 min para *cry1* y extensión a 72°C por 1 min., al final se hace un paso extra de extensión a 72°C por 10 min. Las condiciones para otros *primers* generales fueron similares, excepto que la temperatura de hibridación fue de 49°C para *cry8*, 51°C para *cry 11*, *cyt1* y *cyt2*, 60°C para *cry2* y *cry4*. (Tabla 3). Los productos de las reacciones de PCR se visualizaron con el método de electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris Borato EDTA: 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8) a 100 V por 40 a 60 minutos y teñido con bromuro de etidio para visualizar las bandas utilizando luz UV.

4.3.6 Análisis de diversidad genética con secuencias REP

El análisis de la diversidad genética de las cepas nativas de *B. thuringiensis* fue realizado en el CIBN, para lo cual se evaluó secuencias repetitivas de DNA mediante amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR), siguiendo el método de Versalovic *et al.*, (1991), modificado de la siguiente manera: Se utilizó el DNA genómico extraído de las 53 muestras nativas y se trabajo con 10 cepas estándares de *B. thuringiensis* conservadas a -20°C y una estándar adicional a las 9 anteriormente utilizadas (*B. thuringiensis kurstaki* 732). La reacción de amplificación fue realizada con 2,0 µL de buffer 10X, 8,0 µL de dNTPs 2,5 mM, 2 mM MgCl₂, 2 µM *primers* REP-1 y REP-2, 2U *Taq* Platinum, (Invitrogen®), 1uL DNA 100ng/µL, agua Mili Q para completar un volumen de 20 µL de mezcla de reacción. La secuencia de los *primers* REP aparecen en la Tabla 3.

La PCR fue realizada en un termociclador Applied Biosystems Veriti con gradiente del CIBN, para lo cual se usó el siguiente programa: 4 min a 94°C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 2 min a 72°C y una

extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, agregando 2 µL de buffer de carga con colorante a 15 µL de cada muestra de DNA amplificado; 10 µL fue sembrado en el gel de agarosa al 1.5%.

4.3.6.1 Análisis de patrones de bandas REP PCR:

Los patrones de bandas REP-PCR obtenidos fueron identificados por sus velocidades de migración específicas en el gel. Se construyó matrices binarias (0/1) para ser comparadas con los patrones; la presencia de una banda fue indicada por uno (1) y la ausencia como cero (0). Una vez obtenida la matriz binaria, se construyó una matriz de distancias genéticas empleadas para construir un dendograma con el algoritmo UPGMA (método de agrupamiento de pares no ponderados con significancia aritmética) (Backeljau, 1996).

La similitud entre las cepas fue determinada empleando los coeficientes de Jaccard. El análisis de clúster o agrupamiento fue evaluado en el dendograma generado por el algoritmo UPGMA y representado con el dendograma de similitud de cepas estándar (n=10) y nativas (n=53) de *B. thuringiensis*, estimado con los patrones de bandas REP-PCR, utilizando el programa NTSYS (Peruca, 2008; Backeljau, 1996).

4.3.7 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos amplificados de la PCR se sometieron a separación por el método de electroforesis en gel de agarosa al 1; 1,5 y 2%, preparada en una solución amortiguadora de TBE X, conteniendo 0.1% de bromuro de etidio para visualizar las bandas usando iluminación UV con un fotodocumentador (BIORAD®), o un Transiluminador, la electroforesis se realizó a voltaje constante de 80 a 100 voltios por 1 a 2 horas, utilizando solución amortiguadora TBE X como buffer de corrida.

4.3.8 Secuenciamiento

4.3.8.1 Purificación de PCR para secuenciamiento

Se utilizó el protocolo de Exo-SAP (Exonuclease I - Shrimp Alkaline Phosphatase) (PCR Product Pre-Sequencing KIT, UBS Corporation), antes de proceder a llevar los productos de PCR al secuenciamiento. Las enzimas hidrolíticas, exonucleasa I recombinante y el SAP, digirieron el exceso de iniciadores y degradaron el excedente de los nucleótidos del PCR respectivamente. Para ello se utilizó 5 mL del producto amplificado y 1 μ L del SE (0.5 μ L DB, 0.25 μ L SAP, 0.25 μ L de EXO), la reacción se llevó a cabo en un termociclador Biorad DNA Engine Dyad, Peltier, incubando 30 min a 37°C, 15min a 80°C y 10°C en infinito.

4.3.8.2 Secuenciamiento del DNA Plasmídico

Los productos de PCR sin impurezas preparados anteriormente fueron secuenciados usando 1 μ L de 2 *primers* F y 2 μ L de purificado. Las muestras fueron enviadas a un laboratorio particular para su posterior secuenciamiento. La secuencia de nucleótidos fueron generadas usando un equipo secuenciador capilar 3730 Applied Biosystems (Foster City, CA).

4.3.8.3 Análisis de Datos

Las secuencias a analizar fueron alineadas y editadas usando el software Sequencher v. 4.9 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) y el Bio Edit. Finalmente las secuencias editadas fueron comparadas con el banco de datos genéticos (GEN BANK) usando el programa de informática BLASTN, para la determinación de la identidad de las secuencias de cada una de las cepas problemas.

4.3.9 Bioensayos de entomotoxicidad

Se realizó un bioensayo preliminar para determinar la actividad insecticida de las cepas de *B. thuringiensis* utilizando larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* procedente de las ciudades de Chulucanas y Trujillo.

4.3.9.1 Obtención de formas larvarias de mosquitos

Los huevos de *Aedes aegypti* procedentes de las zonas de Chulucanas y Trujillo fueron proporcionados en tiras secas de papel, éstas se sumergieron en una fuente aporcelanada con agua de clorada y eclosionaron a las 24 horas en un ambiente controlado a 25°C por un fotoperiodo de 12/12h y 98% de humedad relativa, luego de tres a cuatro días se obtuvieron larvas de tercer estadio para los bioensayos. Los huevos y las larvas fueron alimentados cada 24 horas con una preparación comercial en polvo, comida para peces de acuario (según metodología estandarizada por la OMS).

4.3.9.2 Establecimiento de colonias de mosquitos

Cuando las larvas de *Aedes* pasaron al estadio de pupas fueron trasladadas en vasos colectores hasta los insectarios de la Facultad de Ciencias Biológicas, para la obtención de las formas adultas que eran alimentadas con sangre de *Cavia porcellus* (cuy) y así poder obtener nuevamente huevos y mantener las colonias de huevos que serían recogidos en hojas de papel de filtro y dejadas secar, para su posterior uso en los bioensayos.

4.3.9.3 Bioensayo preliminar de entomotoxicidad en laboratorio

Se siguió el método de Armengol *et al.*, (2006), con las modificaciones de la OMS. Se trabajó con 37 cepas nativas caracterizadas molecularmente como *B. thuringiensis*. Los ensayos se hicieron con 25 larvas por cepa a probar. La actividad tóxica de las cepas de *B. thuringiensis* fue evaluada 24 horas después de inocular 100, 200 y 1000 µL del cultivo completo de bacterias a 25 larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* depositadas en recipientes de plástico con 100ml de agua de clorada. *B. thuringiensis* HD-500 *israelensis* y buffer fosfato salino (PBS: 1.44g Na₂HPO₄; 0,24g KH₂PO₄; 8,0g NaCl; 0,2g, KCl en 1000 ml de agua destilada, pH 7,2) fueron usados como control positivo y negativo respectivamente. En cada bioensayo se realizaron tres replicas del grupo larval tratado y del control y además se repitieron en dos días diferentes.

Las lecturas de la mortalidad se registraron a las 24, 48 y 72h. Los rangos de toxicidad fueron determinados para la cepa que produjo 100% de mortalidad en el bioensayo preliminar. Se prepararon diluciones seriadas con PBS estéril a partir del liofilizado en un rango de concentración de 550 a 1.1 ngmL⁻¹, la actividad tóxica fue representada como la CL₅₀, cuyo valor es la cantidad de células bacterianas necesarias para matar el 50% de las larvas de *A. aegypti* en 24 horas a temperatura ambiente.

4.3.9.4 Análisis de entomotoxicidad

El análisis de la toxicidad de las cepas evaluadas o actividad insecticida se realizó según el programa Probit 1.5, programa desarrollado por EMSL-Cincinnati (Environmental Monitoring Systems Laboratory-Cincinnati) coordinado por la Agencia de Protección Medio Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA), todo en base al Método Probit o Probit Analysis (Finney, 1971).

La mortalidad se evaluó cada 24 h, siendo la duración del bioensayo 72h.

V. RESULTADOS

Del total de muestras de la colección de cepas estudiadas, 57 fueron nativas, aisladas de rizósfera (suelo tierra) de cultivos de interés agronómico colectadas en 9 departamentos de nuestro país, las cuales se usaron para determinar genes *cry* y *cyt* con oligonucleótidos universales, las dos cepas de Chiclayo se perdieron y sólo se hizo los estudios bioquímicos, se usaron 9 cepas estándar como referencia. Para realizar el análisis de REP-PCR, se usaron 10 referenciales o estándar y 53 muestras nativas, se agregó la cepa *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD - 732. (Tabla 1^a y 1Tabla 1B).

TABLA 1A. Cepas estándar de *B. thuringiensis* evaluadas para REP-PCR, genes *cry* y *cyt*

CEPA	Variedad	Código	Observaciones
ESTÁNDAR (n=10)	Bt israelensis	HD-500	
	Bt aisawai	HD-130	
	Bt monterrey	GM33	
	Bt israelensis	WHO-2013-9	
	Bt kurstaki	HD-1	
	Bt kurstaki	HD-2	
	Bt kurstaki	HD-73	
	Bt israelensis	HD-968	
	Bt kurstaki	HD-263	
	Bt kurstaki	HD-732	Se adicionó para amplificar REP

Las cepas estándar utilizadas en el presente trabajo fueron proporcionadas por el Ph. D. Daniel R. Zeigler. The Bacillus Genetic stock Center-Department of Biochemistry, the Ohio State University.

TABLA 1B. Cepas nativas de *B. thuringiensis* evaluadas para REP-PCR y genes *cry* y *cyt*

CEPAS	Variedad	Código*	Muestra	Observaciones
NATIVAS (n=55)	Bt	Jun1	Tierra	
	Bt	Jun2	Tierra	
	Bt	Jun3	Tierra	
	Bt	Jun4	Tierra	
	Bt	Jun5	Tierra	
	Bt	Jun6	Tierra	
	Bt	Jun7	Tierra	
	Bt	Jun8	Tierra	
	Bt	Jun9	Tierra	
	Bt	Jun10	Tierra	
	Bt	Jun11	Tierra	
	Bt	Jun12	Tierra	
	Bt	Jun13	Tierra	
	Bt	Jun 14	Tierra	
	Bt	Hua1	Tierra	
	Bt	Hua2	Tierra	
	Bt	Hua3	Tierra	
	Bt	Hua4	Tierra	
	Bt	Hua5	Tierra	
	Bt	Hua6	Tierra	
	Bt	Hua7	Tierra	
	Bt	Hua8	Tierra	
	Bt	Hua9	Tierra	
	Bt	Hua10	Tierra	
	Bt	Hua11	Tierra	
	Bt	Hua12	Tierra	
	Bt	Hua13	Tierra	
	Bt	Hua14	Tierra	No se usó para REP
	Bt	Ica1	Tierra	
	Bt	Ica2	Tierra	
	Bt	Ica3	Tierra	
	Bt	Ica4	Tierra	
	Bt	Ica5	Tierra	
	Bt	Ica6	Tierra	
	Bt	Ica7	Tierra	
	Bt	Ica8	Tierra	
	Bt	Ica9	Tierra	
	Bt	Ica10	Tierra	
	Bt	Ica11	Tierra	
	Bt	Ica12	Tierra	
	Bt	Ica13	Tierra	
	Bt	Ica14	Tierra	
	Bt	Cuz1	Tierra	
	Bt	Cuz2	Tierra	
	Bt	Cuz3	Tierra	
	Bt	Cuz4	Tierra	
	Bt	Cuz5	Tierra	
	Bt	Cuz6	Tierra	
	Bt	Cuz7	Tierra	
	Bt	Cuz8	Tierra	
	Bt	Cuz9	Tierra	
	Bt	Cuz10	Tierra	
	Bt	Caj1	Tierra	
	Bt	Are1	Tierra	No se usó para REP
	Bt	Tac1	Tierra	

*Según procedencia

Para la caracterización molecular de cepas de *B. thuringiensis*, se consideró seguir el criterio de selección que las incluye en el grupo de *B. thuringiensis*, para lo cual las observaciones bajo el microscopio de luz con contraste de fase (1000X), reveló la presencia de esporas y cristales paraesporales, identificando la presencia y morfología de la inclusión cristalina paraesporal típica; se observaron cepas que presentaban cristales bipiramidales, romboidales, cuboidales, cuadrados, redondeados y formas irregulares atípicas. La mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* presentaron cristales cuboidales y bipiramidales, tal como se aprecia en las Figuras 1A y 1B.

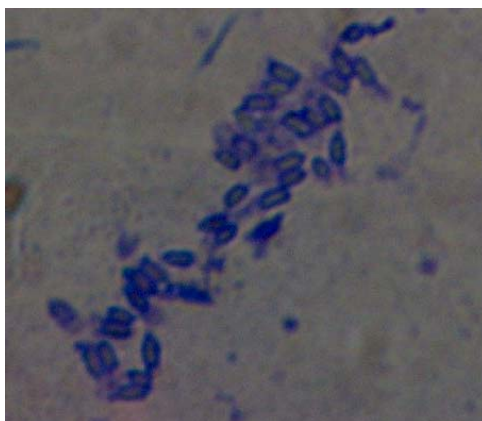


FIGURA 1A. Microfotografía por contraste de fase, esporas y cristales romboidales, cuboidales de *B. thuringiensis*. Tinción con azul brillante de Coomassie de cepa nativa, lca 3. Aumento 100X



FIGURA 1B. Microfotografía por contraste de fase de cristales bipiramidales de la cepa Cuz8 de *B. thuringiensis*. Tinción con verde de Malaquita. (100 X).

Proteínas Cry

Para apoyar la caracterización bioquímica de las cepas aisladas de *B. thuringiensis* es necesario analizar diversos parámetros que permitan realizar la descripción adecuada de las cepas. Uno de estos parámetros es el patrón proteico, por ello fueron caracterizadas bioquímicamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, la que permite separar las proteínas Cry de acuerdo a su peso molecular.

El análisis mediante SDS-PAGE de las δ -endotoxinas reveló que las cepas estudiadas presentaron un perfil de proteínas Cry semejante al de cepas referenciales usadas como estándar. Los resultados mostraron que las cepas nativas estudiadas contienen mezclas de δ -endotoxinas, la mayoría presentan gran variabilidad en pesos moleculares que oscilan entre 36 y menor a 116 kDa. Las cepas de Cajamarca, Arequipa y Chiclayo examinadas presentaron una banda de proteína de 97 kDa y otra de aproximadamente 70 kDa, las que coinciden con cepas estándar como control positivo. Unas pocas cepas presentaron bandas de 130 kDa, como la que se observa en el carril 3 procedente de Chiclayo, la que correspondería a las toxinas Cry1; la cepa de Arequipa presentó una banda de proteína con masa molecular cercana a 70 kDa correspondiente a las proteínas Cry2, lo cual coincide con los genes identificados por PCR; la cepa de Cajamarca presenta un patrón de banda de mayor variedad de pesos moleculares y en el PCR la muestra amplificó con más de un gen, aproximadamente con 5, pero en el alineamiento se observó que esta cepa Caj1 coincide con secuencias de referencia de los genes *cry 2* y *cyt 2Ba*. Una cepa estándar que en la figura 2 aparece en el carril 8, presenta una banda de 130 kDa, otra de aproximadamente 70 kDa y una de 27 kDa, lo cual coincide con la banda típica de la cepa HD1 y que presenta actividad insecticida contra especies del orden Lepidóptera y pertenece al grupo de proteínas Cry 1 (Figura 2).

En las muestras nativas también se observan bandas menores a 36 kDa, las que podrían tratarse de las δ -endotoxinas tipo Cyt que son pequeñas con 25 a 28 kDa, según la Tabla 14 algunas cepas nativas alinean con secuencias de referencia del gen *cyt 2Ba* y en la Fig 2 se observan bandas por debajo de 36 kDa, como es el caso de la cepa Caj1.

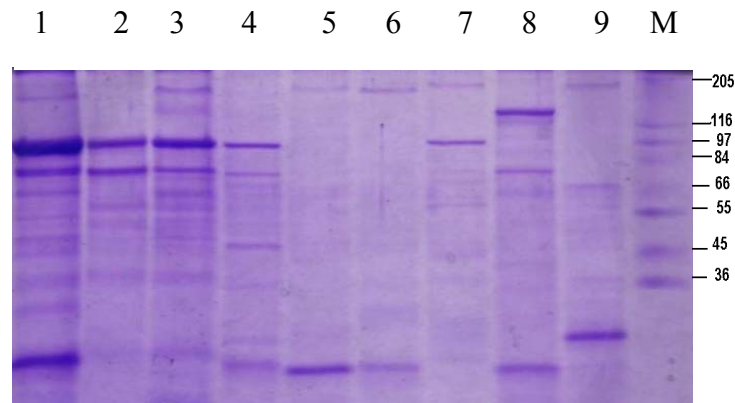


FIGURA 2. SDS-PAGE. de *B. thuringiensis* con azul de Coomassie. 1 Cajamarca, 2 Arequipa, 3 Chiclayo, 4 Control (+), del 5 al 7 cepas mexicanas. Carril 8: HD-1 (bandas de 130, 70 y 27 kDa). 9: cepa mexicana . M: Marcador de peso molecular.

5.2 Análisis de diversidad de genes *cry* y *cyt* con REP-PCR

Se evaluó un total de 63 cepas, 10 estándares y 53 nativas, de *B. thuringiensis*. Los amplificados obtenidos de las secuencias REP contiguas generaron patrones electroforéticos distintivos entre las diversas cepas evaluadas, describiendo un patrón polimórfico; la mayoría de patrones presentó un promedio de 13 a 15 bandas (Figura 3), como se observa en el gel de agarosa, tal como ha sido comunicado en (Versalovic, 1991; Lima, 2002; Reyes-Ramirez, 2005; Sauka, 2010).

La figura 3 muestra una de las corridas electroforéticas obtenidas para estudiar la diversidad de los genes *cry* y *cyt*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

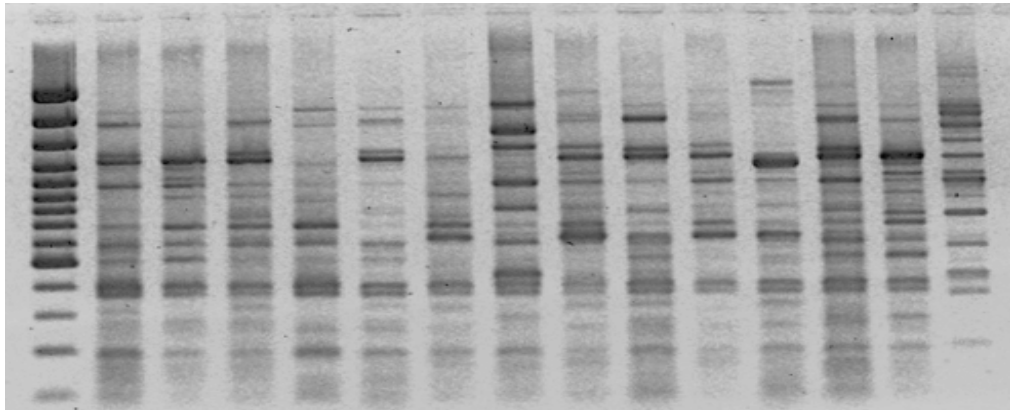


FIGURA 3. Análisis de diversidad de *B. thuringiensis* según REP-PCR. Agarosa 1.5% de amplificados REP. Los números corresponden a: 1.Lader; 2.HD-1; 3. Hua 14; 4.Jun10; 5.Hua10; 6.lca8; 7.HD-2; 8.lca9; 9.lca10; 10.Cuz8; 11.Hua11; 12.Jun11; 13.lca11; 14.HD-73; 15. HD-968.

Estos resultados fueron corroborados cuando se analizó la matriz binaria y se generó el dendograma de similitud (Fig. 4) (UPGMA).

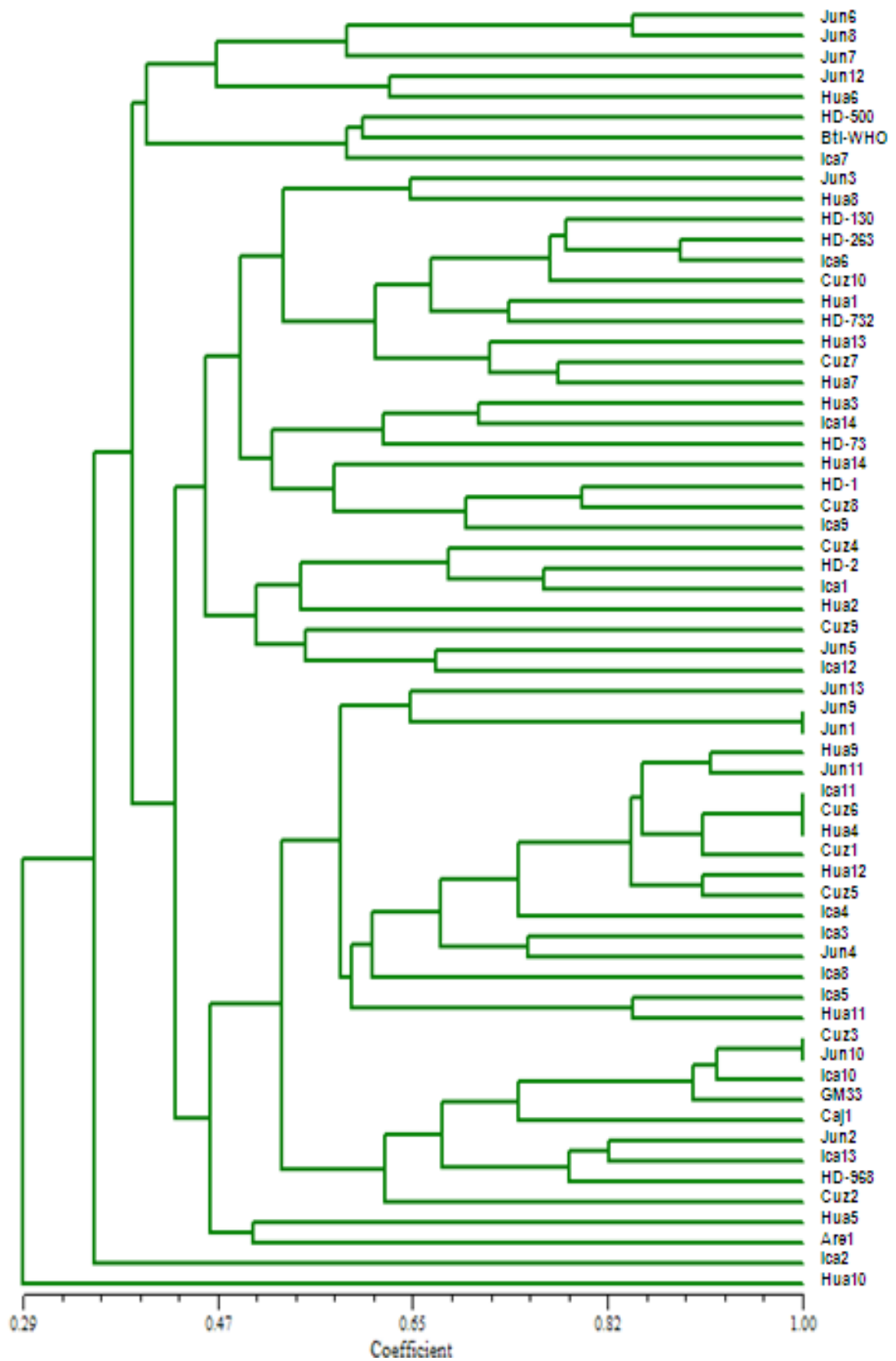


FIGURA 4. Análisis de cluster representado con el dendrograma de similitud de cepas estándar (n=10) y nativas (n=53) de *B. thuringiensis*, estimado con los patrones de bandas REP-PCR. Se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard y el método UPGMA (unweighted-pair group method with arithmetic means).

El análisis de clúster representado con su dendograma de similitud de cepas nativas y estándares de *B. thuringiensis* basado en los patrones electroforéticos REP, y evaluado con el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA nos muestra, en general, tres grandes agrupamientos o clúster (Tabla 2)

TABLA 2. Agrupamientos derivados del dendograma de similitud de cepas nativas y estándar evaluadas

GRUPO	SUBGRUPO	Cepas nativas	Cepas estándar
I		Jun 6,7,8,12 Hua 6 Ica 7	HD-500 BtWHO
II	S1 Sub Grupo 2.1	Jun 3 Hua 8,1,13,7 Ica 6 Cuz 10, 7	HD-130 HD-263 HD-732
	S2 Sub Grupo 2.2	Hua 3,14 Ica 14,9 Cuz 10,7	HD-73 HD-1
	S3 Sub Grupo 2.3	Cuz 4,9 Ica 1,12 Hua 2 Jun 5	HD-2
III	S1 Sub Grupo 3.1	Jun 13,9,1,11,4 Hua 9,4,12,11 Ica 11,4,3,8,5 Cuz 6,5	
	S2 Sub Grupo 3.2	Cuz 3,2 Jun 10,12 Ica 10,13,2 Caj 1 Hua 5,10 Are1	GM 33 HD-968

El primer grupo incluyó las cepas nativas de Junín (Jun6, Jun7, Jun8, Jun12), Huaral e Ica y las cepas estándar HD-500 y Bti-WHO.

El segundo grupo fue el más grande y con mayor número de subgrupos, incluyó las cepas nativas de Junín, Huaral, Ica y Cusco y las cepas estándar, formando tres subgrupos: el subgrupo 1: HD-130/HD-263/HD-732; subgrupo 2: HD-73/HD-1 y el subgrupo 3: HD-2.

El tercer grupo incluyó a las cepas nativas de Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa y Cajamarca, y las cepas estándar HD-968 y GM33, existiendo la particularidad de que el subgrupo más grande (3.1) sólo está conformado por cepas nativas, las cepas Are1 y Hua5 fueron las más disímiles entre ellas; las cepas Jun1 y Jun9 fueron muy similares al igual que Ica11, Cuz6 y Hua4, y Cuz3 y Jun10. La cepa Hua10 (Huaral) es la que más se alejó en similitud de las cepas *B. thuringiensis* estudiadas, al igual que Ica2, conformando una sola rama aislada de los tres grandes agrupamientos.

Destacaron dos cepas caracterizadas como potencialmente tóxicas contra *Aedes aegypti* (Ica10 y Caj1). Formaron un subgrupo o clúster con las cepas estándar tóxicas HD-968 y GM 33, que contienen el gen *cry2*, y las nativas presentaron los genes *cry2* y *cry4*.

En general, utilizando el análisis REP-PCR, se observa una gran diversidad de las cepas nativas de *B. thuringiensis* procedentes de diferentes lugares de Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa y Cajamarca, con cierta tendencia a formar subgrupos según procedencia geográfica y en relación de similitud con las cepas *B. thuringiensis* estándares.

5.3 Determinación de genes *cry* y genes *cyt*

Las 55 cepas nativas de *B. thuringiensis* estudiadas fueron caracterizadas en términos de la presencia de genes *cry* y genes *cyt*. Al respecto el contenido de genes *cry* y *cyt* en el total de cepas nativas peruanas analizadas de *B. thuringiensis* se determinó mediante la técnica de PCR, utilizando *primers* u oligonucleótidos generales para los genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry8*, *cry11*, *cyt1* y *cyt2*. Los *primers* empleados para estos genes y los tamaños de los amplificadores y sus temperaturas de hibridización se muestran en la Tabla 3

TABLA 3. PRIMERS PARA EVALUAR DIVERSIDAD REP-PCR E IDENTIFICAR GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis*

GEN	SECUENCIA DE LOS PRIMERS (OLIGONUCLEÓTIDOS)	amplificado (pb)	Tº ANNEALING (ºC)
<u>Primers REP</u>			
REP1R-I	5' IIIICgICgICATCIggC 3'	Varios	45
REP2 I	5' ICgICTTATCIggCCTAC 3'		
<u>Primers cry</u>			
<i>cry1</i> GRAL	5' CTGGATTTACAGGTGGGGATAT 3' 5' TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT 3'	543-558	52
<i>cry2</i> GRAL	5' GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT 3' 5' GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG 3'	700	60
<i>cry4</i> GRAL	5' GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC 3' 5' GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC 3'	700	60
<i>cry8</i> GRAL	5' ATGAGTCCAAATAATCTAAATG 3' 5' TTTGATTAATGAGTTCTTCCACTCG 3'	370	49
<i>cry11</i> GRAL	5' TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC 3' 5' CATTGTACTTGAAGTTGTAATCCC 3'	300	51
<u>Primers cyt</u>			
<i>cyt1</i> GRAL	5' CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT 3' 5' TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT 3'	525	51
<i>cyt2</i> GRAL	5' ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC 3' 5' TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC 3'	525	51

El DNA geonómico y plasmídico extraído de cada cepa de *B. thuringiensis* se utilizó como molde en la reacción de PCR y fueron amplificados fragmentos usando *primers* universales para cada grupo de genes. Con el DNA genómico se observó la amplificación de pocos genes, dos cepas nativas aisladas amplificaron con gen *cry1* y tres cepas amplificaron con *cry11*, dos de las cuáles eran cepas estándares.

El análisis de genes *cry* y *cyt* de las 55 cepas nativas estudiadas mediante PCR, empleando 5 secuencias de genes *cry* (*cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry8*, *cry11*) y dos de genes *cyt* (*cyt1*, *cyt2*) revelaron que 52 (94%) fueron positivas en presencia de los genes *cry* y *cyt*. Del total de cepas, 12 contienen sólo un tipo de los genes estudiados, 3 cepas no amplifican y 40 cepas contienen más de 1 tipo de gen *cry* o *cyt*, 16 cepas aisladas contienen dos genes diferentes, 14 cepas contienen 3 genes diferentes, 7 cepas contienen 4 genes diferentes, dos contienen 5 genes diferentes y 1 cepa contiene 6 fragmentos génicos diferentes. En la Tabla 4 se muestra el contenido de los genes examinados en las cepas estándar, donde se observa que en ellas también se encuentran entre 3 a 5 genes diferentes. Se observaron genes *cyt1* en todas las cepas estándar y los genes *cyt2* sólo en las cepas HD-500, HD-130 y HD-968.

TABLA 4. GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* ESTÁNDAR

Código	B. thuringiensis	Bio ensayo	Genes identificados por tamaño de amplificado							% todos genes/ cepa		
			<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>			
HD-500	israelensis	+		+	+			+	+	+	05	71.4
HD-130	aisawai	+	+	+	+				+	+	05	71.4
GM33	monterrey	-	+	+	+	+			+		05	71.4
WHO-2013-9	israelensis			+	+				+		03	42.8
HD-1	kurstaki		+	+	+				+		04	57.1
HD-2	kurstaki		+	+	+	+			+		05	71.4
HD-73	kurstaki			+	+				+		03	42.8
HD-968	israelensis	+		+	+	+			+	+	05	71.4
HD-263	kurstaki			+	+				+		03	42.8
			03	04	09	09	03	01	09	03		
			% c/ gen	44.4	100	100	33.3	11.1	100	33.3		

Las Tablas 5 al 11 contienen los datos numéricos y porcentuales de los genes *cry* y *cyt* contenidos en las cepas estudiadas según su procedencia, la Tabla 12 contiene un resumen del total del contenido de genes en todas las cepas de los departamentos estudiados.

TABLA 5. GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* DE JUNIN

Código	Bio ensayo	Genes identificados por tamaño de producto PCR							% genes /cepa
		<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>	
Jun 1	-		+						14.3
Jun 2			+						14.3
Jun 3	-	+	+	+		+	+	+	85.7
Jun 4	-	+	+	+			+		57.2
Jun 5		+	+				+		42.5
Jun 6	-	+	+	+			+		57.2
Jun 7	-	+	+	+					42.5
Jun 8		+	+	+					42.5
Jun 9	-		+	+					28.6
Jun 10			+						14.3
Jun 11		+	+	+					42.5
Jun 12			+	+				+	42.5
Jun 13	-		+	+					28.6
Jun 14	-		+						14.3
		07	14	09	00	01	04	02	
	% c/ gen	50	100	64	00	7	28	14	

TABLA 6. GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* DE LIMA (HUARAL)

Procedencia	Bio ensayo	Genes identificados por tamaño de producto PCR							% genes c/ cepa	
		<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>		
Hua 1			+						14.3	
Hua 2	-	+	+					+	+	57.2
Hua 3	-	+	+					+	+	57.2
Hua 4	-		+							14.3
Hua 5		+	+							28.6
Hua 6	-		+	+				+	+	57.2
Hua 7		+	+	+						42.5
Hua 8		+	+	+						42.5
Hua 9	-									00.0
Hua 10	-		+							14.3
Hua 11		+								14.3
Hua 12	-		+					+		28.6
Hua 13			+					+	+	42.5
Hua 14			+		+					28.6
		06	12	03	01	00	05	04		
	% c/ gen todas cepas	42.8	85.7	21.4	07	00	35.7	28.6		

TABLA 7. GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* DE ICA

Procedencia	Bio ensayo	Genes identificados por tamaño de producto PCR							% todos genes c/ cepa
		<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>	
Ica 1	-	+	+						28.6
Ica 2	-	+	+	+			+	+	71.4
Ica 3	-		+						14.3
Ica 4	-	+	+						28.6
Ica 5	-		+						14.3
Ica 6		+	+						28.6
Ica 7	-		+						14.3
Ica 8			+			+	+		42.5
Ica 9	-		+	+	+				42.5
Ica 10	+		+	+					28.6
Ica 11									0.00
Ica 12									0.00
Ica 13		+	+	+			+		57.2
Ica14	-					+			14.3
		05	11	04	01	02	03	01	
	% c/ gen	35.7	78.6	28.6	07	14.3	21.4	07.1	

TABLA 8. GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* DEL CUZCO

Procedencia	Bio ensayo	Genes identificados por tamaño de producto PCR							% todos genes c/ cepa
		<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>	
Cuz 1			+	+			+	+	57.2
Cuz 2	-	+	+						28.6
Cuz 3	-		+	+					28.6
Cuz 4	-	+	+	+					42.5
Cuz 5	-	+	+	+					42.5
Cuz 6	-	+	+						28.6
Cuz 7			+				+		28.6
Cuz 8		+	+	+					42.5
Cuz 9	-		+					+	28.6
Cuz 10	-		+	+				+	42.5
		05	10	06	00	00	02	03	
	% c/ gen	50	100	60	00	00	20	30	

TABLA 9. GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* DE CAJAMARCA

Genes identificados por tamaño de producto PCR								
Procedencia	Bio ensayo	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>
Caj 1	+	+	+	+	+			+
		01	01	01	01	00	00	01

TABLA 10. GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* DE AREQUIPA

Genes identificados por tamaño de producto PCR								
Procedencia	Bio ensayo	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>
Areq 1			+			+		
		00	01	00	00	01	00	00

TABLA 11. GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* DE TACNA

Genes identificados por tamaño de producto PCR								
Procedencia	Bio ensayo	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>
Tac 1	-	+				+		
		01	00	00	00	01	00	00

TABLA 12. RESUMEN DE GENES *cry* y *cyt* EN CEPAS DE *B. thuringiensis* DE DIFERENTES DEPARTAMENTOS DEL PERU

Presencia (nº de cepas que lo presentan) de genes identificados por tamaño de producto PCR								
Dpto. Procedencia	nº cepas	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>
JUNIN	14	07	14	09	00	01	04	00
LIMA - Huaral	14	06	12	03	01	00	05	04
ICA	14	05	11	04	01	02	03	01
CUZCO	10	05	10	06	00	00	02	03
CAJAMARCA	1	01	01	01	01	00	00	01
Tacna	1	01	00	00	00	01	00	00
Arequipa	1	00	02	00	00	01	00	00
TOTAL	55	25	50	23	03	05	14	09
%	100	45	91	42	5	10	25	16

Se observó que ciertas cepas de *B. thuringiensis* nativas, además de presentar el amplificado esperado, amplifican otros fragmentos de tamaños diferentes; lo que también pudo observarse en las cepas estándar.

El 91% de las cepas de *B. thuringiensis* que fueron analizadas tenían al gen *cry2* como el más abundante (Fig. 5b y 5e), en segundo lugar encontramos el gen *cry1* (45.5%) Fig. 5a y en tercer lugar el gen *cry4* (41.8%) Fig. 5d. Los grupos que se presentan en menor cantidad en estas cepas analizadas son los genes *cry8* y *cry11* y el gen *cyt2* en segundo lugar.



Figura 5a. Gel de agarosa 1% de los amplificados con primer universal *cry1*, para algunas cepas de *B. thuringiensis*. Nº 1. HD-500; 2. Caj1; 3. HD-130; 4. Jun7; 5. Cuz5; 6. GM33; 7. Ica6; 8. Mexico; 9. HD-2; 10. Ica10; 11. Cuz8; 12. HD-968; 13. Estándar.

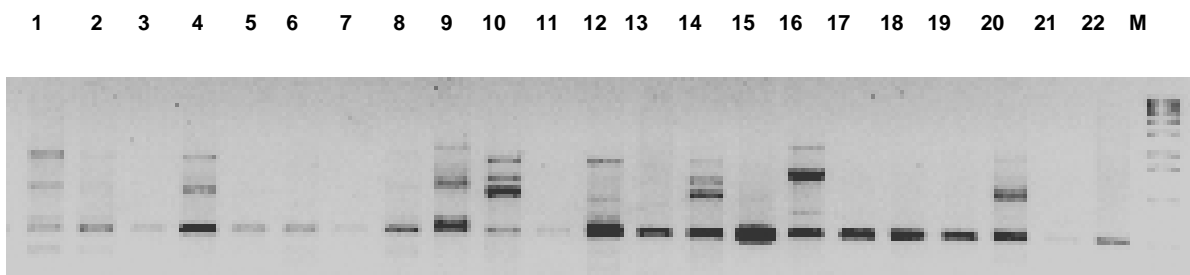


Figura 5b. Gel de agarosa 1% de los amplificados PCR con primer universal *cry2*. Los números corresponden a las cepas de *B. thuringiensis* analizadas. 1. Ica6; 2. Ica7; 3. Mex; 4. Cuz6; 5. Cuz7; 6. Jun8; 7. Jun9; 8. HD-1; 9. Hua; 10. Jun10; 11. Hua10; 12. Ica8; 13. Ica9; 14. Ica10; 15. Cuz8; 16. Hua; 17. Jun11; 18. Ica11; 19. HD-73; 20. Hua6; 21. Ica12; 22. Jun; M. Marcador Lambda.

Nuestros resultados también señalan la presencia de genes *cyt1* y *cyt2* en cepas procedentes de Lima-Huaral, Ica y Cuzco, *cyt1* en cepas de Junín y *cyt2* en cepas de *Cajamarca*, no encontrándose ninguno de los dos genes en las cepas analizadas de las ciudades de Tacna y Arequipa.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Figura 5c. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR obtenidos con primer universal *cyt1*, para las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas. Los números corresponden a las cepas, 1. Hua2; 2. Hua3; 3. Hua4; 4. Hua5; 5. Ica1; 6. Cuz1; 7. HD-500; 8. Jun3; 9. Are1; 10. Hua6; 11. Ica2; 12. Cuz2; 13. Jun4; 14. Jun5.

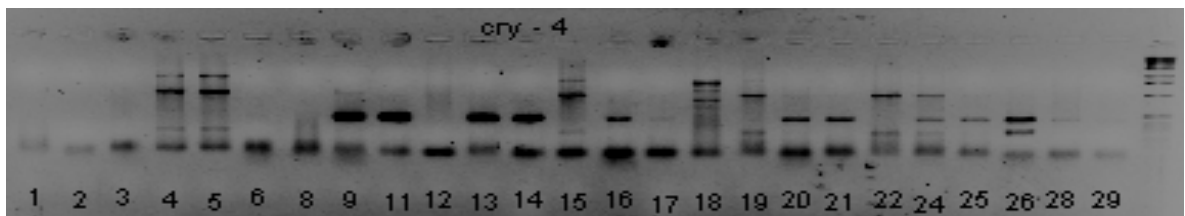


Fig. 5d. Gel de agarosa 1% con primer general *cry4* de los amplificadores de *B. thuringiensis*. Los números listados corresponden a las cepas 1. Jun1; 2. Jun2; 3. Hua1; 4. Hua2; 5. Hua3; 6. Hua4; 8. Ica1; 9. Cuz1; 11. Jun3; 12. Are1; 13. Hua6; 14. Ica2; 15. Cuz2; 16. Jun4; 17. Jun5; 18. Ica3; 19. Tacna; 20. Hua7; 21. J1; 22. Ica4; 24. Cuz3; 25. Hua8; 26. Jun6; 28. Jun7; 29. Cuz4; Marcador: Lambda.



Figura 5e. Gel de agarosa de amplificado PCR obtenidos con *primer* general *cry2* para las cepas utilizadas como control positivo. Los números corresponden a los estándares: 10. HD-500; 27. HD130; 41. WHO2013-9; 42. HD-1; 47. HD-2; 54. HD73; 55. HD-968; 62. HD-263. Las siguientes son cepas nativas: 23. Caj1; 7. Hua5; 14. Ica2; 36. 10B; Marcador.

5.4 Secuenciamiento de genes *cry* y *cyt*

Para confirmar los amplificadores se mandaron a secuenciar las muestras usando un programa SEQUENCHER, el cual permite limpiar, editar, alinear las secuencias obtenidas luego las secuencias fueron comparadas con los programas de bioinformática BLAST para confirmar la identidad de cada una de ellas. Previamente al secuenciamiento se realizó una reacción enzimática para eliminar el exceso de *primers* y dNTPs con SAP y EXO.

Los resultados del alineamiento de secuencias, realizados en los laboratorios del Stephenson Research Center de la Universidad de Oklahoma, Norman, USA, demostraron que las muestras no están completamente limpias, y que de un total de 67 muestras secuenciadas, 62 han sido confirmadas para los genes que amplifican. Así tenemos que respecto al gen *cry 2*, todas las muestras coinciden, presentando la cepa Cuz5 homología de secuencia con *cry 2Ab* lo que equivaldría a un 99% de identidad (Tabla 13).

El análisis BLAST de las secuencias de las muestras analizadas para *cry 4* coinciden en homología de secuencia al igual que las analizadas en su secuencia para *cyt 1* y *cyt 2*, mostrando que hay algunas cepas cuya secuencia se correspondería con *cyt 2Ba*. Hubo cepas que presentan múltiples fragmentos y no alinean, no pudiendo determinar su identidad. En la Figura N° 6a se presenta el electroferograma obtenido de la cepa Ica10 que dio actividad tóxica contra *Aedes aegypti* y que tiene identidad confirmada con el gen *cry 2*, que precisamente es activa para dípteros y lepidópteros. Esta cepa contiene además el gen *cry 4* con actividad para díptero; en la Figura 6b se presenta el electroferograma de una cepa estándar que dio positivo en el bioensayo. La Fig.7 presenta el alineamiento de secuencias del gen *cry4* en las muestras evaluadas.

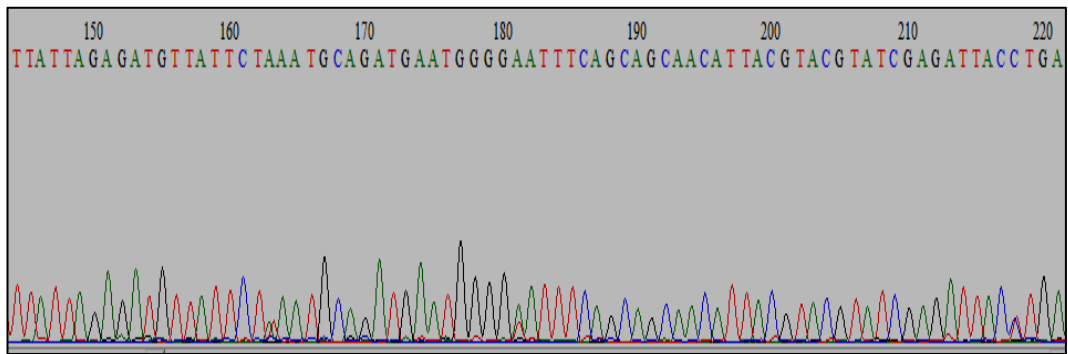


FIGURA 6 a. Secuenciamiento de genes *cry* y *cyt*. Electroferograma de las secuencias parciales del gen *cry2* de Ica10, (+) para bioensayo.

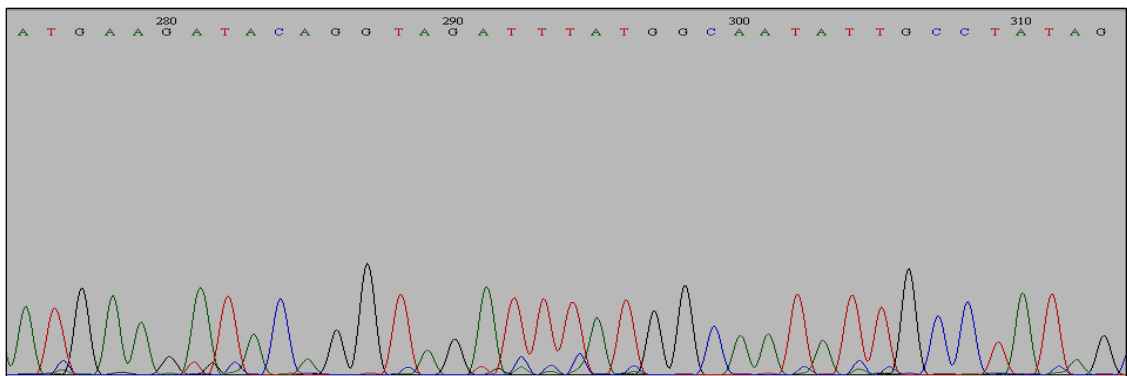


FIGURA 6 b. Electroferograma de las secuencias del gen *cyt2* de la cepa estándar HD-500, (+) para bioensayo.

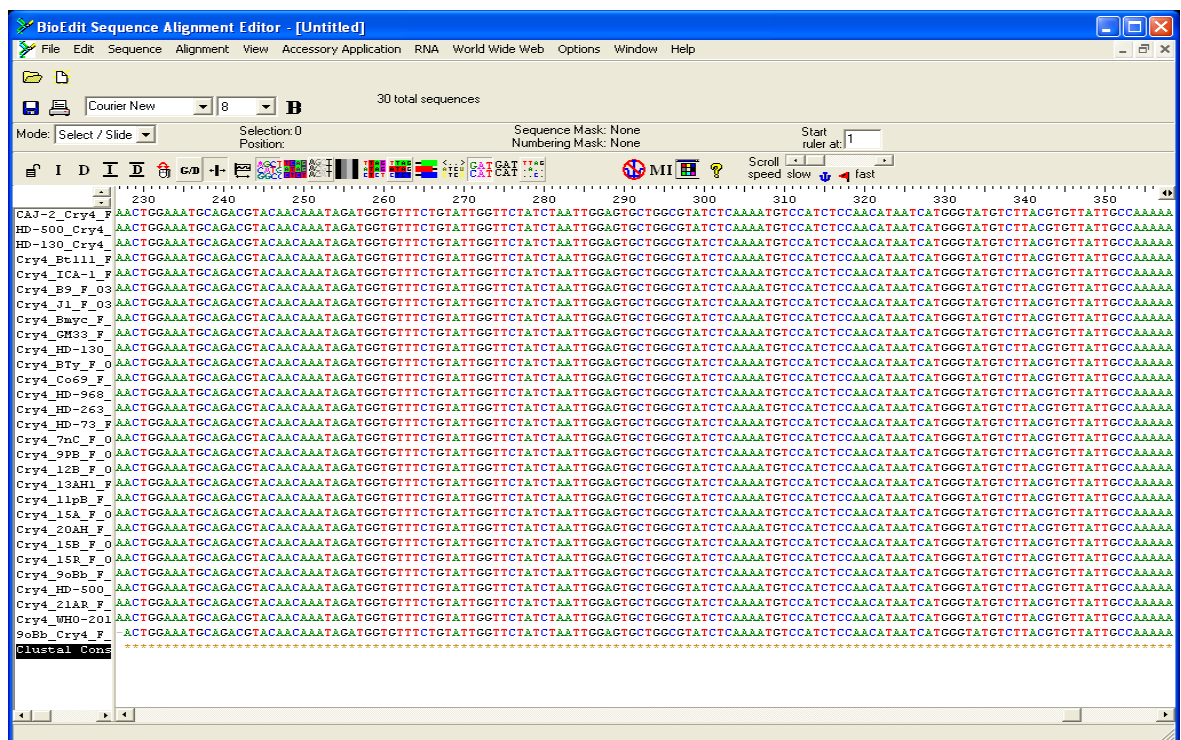


FIGURA 7. Alineamiento de secuencias del gen cry4 (secuencia de consenso). Imagen parcial del alineamiento realizado de las secuencias del gen cry 4 en las muestras evaluadas

TABLA 13. ANALISIS Y CARACTERISTICAS DEL ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LOS GENES *cry* Y *cyt*.

GEN	Cepas Bt evaluadas	Características del alineamiento
<i>cry</i>		
<i>cry1</i> GRAL	Cuz8, Jun7, HD-130, HD-2.	No alinean con secuencia referencia*, hay múltiples fragmentos.
<i>cry2</i> GRAL	Jun2, Jun4, Jun5, Jun6, Jun7, Jun8, Jun9, Jun11, Hua1, Hua6, Hua7, Hua12, Hua13, Ica1, Ica2, Ica5, Ica10, Ica12, Cuz1, Cuz4, Cuz5, Cuz8, Cuz10, Caj1, HD-500, HD-130, HD-73, HD-968, GM33, Mex.	Todas las muestras coinciden con secuencia referencia del gen <i>cry2</i> *. La cepa Cuz5 dio un 95% de identidad con la variedad <i>cry 2Ab</i> . La cepa Mex tiene sólo <i>cry2</i> .
<i>cry4</i> GRAL	Cuz1, Cuz4, Cuz5, Cuz8, Cuz10, Hua6, Hua7, Hua8, Ica2, Ica9, Ica10, Ica12, Jun4, Jun7, Jun11, Caj1.	Todas las muestras coinciden con secuencia de referencia del gen <i>cry4</i> *. La cepa de Caj1 no alinea, presenta múltiples fragmentos.
<i>cry8</i> GRAL	B9, HD-2, HD-968	No alinean con secuencia de referencia del gen <i>cry8</i> *, hay múltiples fragmentos. HD-2 amplifica <i>cry2</i> .
<i>cry11</i> GRAL	Jun3, Are1, Ica13, HD-500.	Jun3 y HD-500 concuerdan con secuencia de referencia del gen <i>cry4D</i> *. Las cepas Are1 e Ica13 coinciden con un fragmento de <i>E. coli</i> .
<i>cyt</i>		
<i>cyt1</i> GRAL	Cuz1, Jun3, Jun4, Hua6, Hua12, Ica12, HD-500, HD-130, HD-968.	Las muestras coinciden con secuencia de referencia del gen <i>cyt1</i> *. HD-73 no alinea, presenta múltiples fragmentos.
<i>cyt2</i> GRAL	Cuz1, Cuz9, Cuz10, Jun3, Jun11, Hua6, Hua12, Caj1.	Coinciden con secuencia de referencia del gen <i>cyt 2Ba</i> *, excepto Jun11 que no alinea con el gen ni con ningún otro gen conocido. La cepa Cuz9 no alinea, presenta múltiples fragmentos.

* Se refiere a las secuencias existentes en el GenBank.

5.5 Bioensayos de entomotoxicidad de *B. thuringiensis* sobre *Aedes aegypti*

En los bioensayos se encontró que el 6.25% de las cepas probadas (Tabla N° 14) tuvieron actividad entomopatógena contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*. Los resultados obtenidos nos muestran que pocas cepas presentaron toxicidad. En los ensayos encontramos que sólo tres cepas, una estándar *B. thuringiensis israelensis* HD-500, y dos cepas nativas Caj1 e Ica 10 fueron tóxicas para las larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*.

Con la cepa estándar *B. thuringiensis israelensis* HD-500, enfrentadas a larvas de *A. aegypti* procedente de las ciudades de Trujillo y Chulucanas, se consiguió 100% de mortalidad a las 24 horas y con las dos cepas nativas Caj1 e Ica 10 se obtuvo 92% y 84% de mortandad respectivamente, a las 72 horas de inoculada a larvas de *A. aegypti* de la ciudad de Trujillo.

La actividad insecticida fue determinada para la cepa estándar HD-500 y para la cepa nativa Caj1, aplicando un programa de análisis Probit 1.5 (Anexo 2) y se determinó una CL50 de 67 ngmL⁻¹ y una CL50 de 83 ngmLI⁻¹ para las cepas HD-500 y Caj1 respectivamente contra larvas de *Aedes aegypti* de Chulucanas en el primer caso y de Trujillo en el segundo (Tabla 15 y 16).

TABLA N° 14. BIOENSAYOS CON CEPAS DE B. thuringiensis EVALUADAS

CEPA		Código	Procedencia	Resultados
ESTÁNDAR	Bt israelen	HD-500		+
	Bt aisawaia	HD-130		+
	Bt monterr	GM33		-
	Bt israelen	WHO-2013-9		
	Bt kurstaki	HD-1		
	Bt kurstaki	HD-2		
	Bt kurstaki	HD-73		
	Bt israelen	HD-968		+
	Bt kurstaki	HD-263		
NATIVAS	Bt	Junin1	Junín	-
	Bt	Junin2	Junin	
	Bt	Junin3	Junin	-
	Bt	Junin4	Junin	-
	Bt	Junin5	Junin	
	Bt	Junin6	Junin	-
	Bt	Junin7	Junin	-
	Bt	Junin8	Junin	
	Bt	Junin9	Junin	-
	Bt	Junin10	Junin	
	Bt	Junin11	Junin	
	Bt	Junin12	Junin	
	Bt	Junin13	Junin	-
	Bt	Junin14	Junin	-
	Bt	Huaral1	Huaral	
	Bt	Huaral2	Huaral	-
	Bt	Huaral3	Huaral	-
	Bt	Huaral4	Huaral	-
	Bt	Huaral5	Huaral	
Bt	Huaral6	Huaral	-	
Bt	Huaral7	Huaral		

Bt	Huaral8	Huaral	
Bt	Huaral9	Huaral	-
Bt	Huaral10	Huaral	-
Bt	Huaral11	Huaral	
Bt	Huaral12	Huaral	-
Bt	Huaral13	Huaral	
Bt	Huaral14	Huaral	
Bt	Ica1	Ica	-
Bt	Ica2	Ica	-
Bt	Ica3	Ica	-
Bt	Ica4	Ica	-
Bt	Ica5	Ica	-
Bt	Ica6	Ica	
Bt	Ica7	Ica	-
Bt	Ica8	Ica	
Bt	Ica9	Ica	-
Bt	Ica10	Ica	+
Bt	Ica11	Ica	
Bt	Ica12	Ica	
Bt	Ica13	Ica	
Bt	Ica14	Ica	-
Bt	Cuzco1	Cuzco	
Bt	Cuzco2	Cuzco	-
Bt	Cuzco3	Cuzco	-
Bt	Cuzco4	Cuzco	-
Bt	Cuzco5	Cuzco	-
Bt	Cuzco6	Cuzco	-
Bt	Cuzco7	Cuzco	
Bt	Cuzco8	Cuzco	
Bt	Cuzco9	Cuzco	-
Bt	Cuzco10	Cuzco	-
Bt	CAJ2	Cajamarca	+

**TABLA 15 VALORES ESTIMADOS DE CONCENTRACIONES LETALES DE
CEPA *B. thuringiensis* HD-500 CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADÍO
DE *Aedes aegypti* MEDIANTE EL PROGRAMA PROBIT VERSIÓN 1.5**

CONCENTRACIÓN LETAL	(ng/mL) Concentración de exposición (Límite Confianza 95%	
		Inferior	Superior
1.0	0.023	0.010	0.034
5.0	0.031	0.016	0.043
10.0	0.037	0.021	0.048
15.0	0.042	0.026	0.053
50.0	0.067	0.053	0.079
85.0	0.109	0.093	0.141
90.0	0.123	0.103	0.167
95.0	0.145	0.118	0.200
99.00	0.200	0.151	0.356

TABLA 16. VALORES ESTIMADOS DE DOSIS LETALES DE *B. thuringiensis* CAJ1 CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADÍO DE *Aedes aegypti* MEDIANTE EL PROGRAMA PROBIT VERSIÓN 1.5

CONCENTRACIÓN LETAL	Concentración Exposición (ng/mL ⁻¹)	Límite Confianza 95%	
		Inferior	Superior
1	0.01	0.003	0.017
5	0.018	0.008	0.028
10	0.025	0.013	0.037
15	0.032	0.018	0.045
50	0.083	0.062	0.105
85	0.216	0.165	0.32
90	0.271	0.201	0.431
95	0.379	0.267	0.678
99	0.712	0.444	1.61

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

B. thuringiensis ha sido usada por más de 40 años como bioinsecticida, como una alternativa en el control de plagas y vectores, su utilidad no solo se limitó a su potencial como controlador biológico sino que sus toxinas se han expresado en el genoma de muchas plantas para resistir a las plagas, es esta estrategia la que ha creado la necesidad de aislar *B. thuringiensis* y crear grandes colecciones con potencial para el control biológico y caracterizarlas molecularmente para así disponer de cepas para realizar bioensayos.

Los mosquitos vectores continúan siendo un serio problema de salud pública en nuestro país y en todo el mundo, entre los más importantes están los géneros *Anopheles*, *Culex* and *Aedes*, los cuales son responsables de transmitir patógenos de enfermedades como la malaria, filariasis, dengue y chikungunya. Siendo la principal estrategia de control de vectores, el uso de agentes de biocontrol, tales como *Bacillus thuringiensis*, (Prazanna, et al., 2011).

La caracterización de cepas de *B. thuringiensis* es de gran importancia toda vez que puede ayudar a conocer la distribución de genes *cry* y entender el rol de esta bacteria en el ecosistema; el método que hemos utilizado en el presente estudio para la caracterización, el de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es altamente sensible, rápido y fácil, adecuado para la detección de secuencias de DNA de interés como es la caracterización de cepas de colecciones, predecir la actividad insecticida a partir de la identificación de genes *cry* y detectar nuevos genes *cry*.

En el presente estudio se han analizado 55 cepas de *B. thuringiensis* nativos aislados de suelo de 8 departamentos del Perú, distribuido en regiones diferentes no sólo por su ubicación sino por su clima, altitud, tipo de suelo, biodiversidad, lo que nos hace pensar en una fuente natural de cepas de *Bacillus thuringiensis* con un contenido de genes *cry* y actividad tóxica conocidas así como con la posibilidad de encontrar cepas con nuevas actividades, dada la megadiversidad que presenta nuestro País.

La diversidad genética y toxicidad de las cepas de *B. thuringiensis* difieren según la región geográfica de donde las cepas de *B. thuringiensis* fueron aisladas (Thomas *et al.*, 2001). Dado que cada lugar es diferente, este podría contener nuevas cepas con potencial tóxico más efectivo para un amplio espectro de insectos. En el Perú al igual que en otros países debe establecerse una colección de cepas nativas de *B. thuringiensis* porque es importante conocer su distribución en las diferentes regiones geográficas de nuestro país, identificar nuevas cepas y evaluar su potencial entomocida, para ayudar a destruir los vectores de plagas y de enfermedades.

6.1 Variedad de inclusiones cristalinas de aislados de *B. thuringiensis*

Carreras *et al.*, 2008, reportan que la morfología de los cuerpos paraesporales estuvo en correspondencia con la actividad biológica de cepas cubanas estudiadas, por eso creemos que determinar la forma de las inclusiones cristalinas paraesporales producidas por *B. thuringiensis* puede proporcionar información valiosa respecto a su acción tóxica ya que estaría relacionada con la presencia de algún gen *cry* en especial, así tenemos que se ha descrito que hay morfologías cristalinas diferentes: cristales bipiramidales relacionadas a proteína Cry1; cuboidales asociadas con Cry2; inclusiones amorfas relacionadas a proteínas Cry4 y Cyt, cristales en forma de barra relacionadas a proteínas Cry4D, (Lopez-Meza & Ibarra, 1996), (Schnepf *et al.*, 1998). La proteína Cry2Aa es tóxica tanto para larvas de lepidópteros y dípteros, mientras que Cry2Ab, Cry2Ac y Cry2Ad son solamente tóxicos para insectos lepidópteros, (Prazanna *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos nos demuestran que en suelos peruanos existen un alto nivel de bacterias formadoras de esporas y que sintetizan inclusiones cristalinas, lo que podría significar la existencia de un alto potencial de cepas con actividad tóxica que serían usadas como bioinsecticidas, como una alternativa para el control de enfermedades metaxénicas, especialmente las causadas por mosquitos y para plagas que afectan la productividad y causan grandes pérdidas en los cultivos agrícolas, lo que en consecuencia originaría

problema de abastecimiento de alimentos para una población que cada día aumenta su tasa de crecimiento.

En el presente trabajo se han observado formas cristalinas cuboidales, bipiramidales y romboidales, como las observadas en las Fig. 1A y 1B, las cuales coinciden con cepas que presentaron al gen *cry2*, *cry1* y *cry4*, respectivamente; habiéndose identificado con un 95% de identidad la cepa Cuz5 con la variedad *cry 2Ab*, que sólo son tóxicos para insectos lepidópteros y al igual que Prazana *et al*, 2011, encontramos que los genes *cry 2*, predominan en la población estudiada.

Las diferencias en los cristales coinciden con las diferencias en el patrón de proteína de las cepas estudiadas, lo cual fue observado por electroforesis, como consta en la Fig.2., la presencia de una banda cercana a los 65 a 70 kDa correspondiente a las proteínas Cry 2 se corrobora con el alto porcentaje de cepas nativas portando el gen *cry2* (*que forman cristales romboidales*), en segundo lugar están las cepas con el gen *cry1*, las que corresponderían a proteínas Cry1 con pesos moleculares cercanos a 130 kDa y que generalmente forman cristales bipiramidales. En algunas cepas se observaron formas cristalinas irregulares y redondeadas, pero en menor cantidad,

6.2 Determinación de Proteínas Cry y Cyt en cepas de *B. thuringiensis*

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y Cyt. A la fecha, se conocen 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). A la fecha, se han clonado y secuenciado 166 diferentes genes *cry* y 16 diferentes genes *cyt* (Soberón y Bravo, 2007).

La determinación del perfil de proteínas de los cristales paraesporales de las cepas estudiadas de *B. thuringiensis*, permitieron calcular el peso molecular de cada una de las toxinas presentes y ayudaron en la caracterización.

Los resultados de nuestro estudio, muestran que la mayoría de cepas estándar presentan gran variabilidad en el número de bandas de proteínas en el rango de 36 a 116 kDa, observándose algunas bandas mayores a 116 kDa y menores a 36 kDa, mientras que las cepas nativas estudiadas contienen mezclas de δ -endotoxinas, ya que algunas sintetizan un grupo de proteínas con un peso molecular entre 30-130 kDa y proteínas con pesos moleculares por debajo de 30 kDa. La banda de 130 kDa, corresponde generalmente a las toxinas Cry 1, que en algunos casos es la más frecuentemente encontrada en las cepas nativas de *B. thuringiensis*, que corresponden a proteínas que generalmente forman cristales bipiramidales, tal como lo reportan estudios realizados por otros autores (Gillis *et al.*, 2007; Carreras *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 1998; Hodgman *et al.*, 1993) quienes encuentran que el gen *cry1* está presente en mayor porcentaje en todas sus muestras analizadas, el cual es específico para Lepidópteros. Prazana *et al.* (2011) reportan que el análisis del perfil proteico mostró proteínas con alta masa molecular así como proteínas de baja masa molecular que corresponden a proteínas Cry y Cyt respectivamente, las bandas de proteínas que ellos encuentran son muy similares a las que se presentan en nuestro estudio (Fig.2) , 101.77 kDa y 94.11 kDa y otros péptidos menores de 64.76 kDa, 32.68 kDa y 17.44 kDa.

Hernández reportó en el 2002 que cepas de *B. thuringiensis* aisladas de muestras de insectos muertos, presentaron una mayor diversidad en los pesos moleculares de las proteínas Cry, en comparación con las cepas aisladas de muestras de suelo, hojarasca, follajes y frutos infestados; en ambos casos se presentó un gran número de cepas con proteínas con pesos moleculares entre los 60 y los 79 kDa, siendo las cepas provenientes de aislamientos de insectos las que presentaron proteínas de pesos moleculares altos, entre los 140 a 145 kDa, las cepas aisladas de muestra de suelo en nuestro estudio coinciden con lo reportado por Hernández, la mayoría alcanza a tener pesos moleculares entre 60 y 97 kDa, fue muy raro encontrar cepas con bandas de proteínas de aproximadamente 130 kDa.

Las cepas nativas procedentes de Cajamarca, Arequipa y Chiclayo Fig. 2,

presentaron bandas de 97 kDa y otra de aprox. 70 kDa, que coinciden con cepas estándar mejicanas usadas como control positivo, estas masas moleculares generalmente se corresponden con *cry2* que forma cristales cuboidales, romboidales y formas irregulares (Rosales y cols. 2003; Carmona A. 2002; Crickmore, *et al.*, 1998). Figuras N° 1 y N° 2.

Este perfil de proteínas coincidiría con los genes *cry2* y *cry4* por ejemplo de la cepa Caj1 que fueron corroborados con el alineamiento y que además dio positiva para *Aedes aegypti* en su actividad tóxica.

Es de interés mencionar que en un estudio realizado se comparo la producción de proteínas Cry por parte de cepas de *B. thuringiensis* nativas y el estándar internacional HD1 en dos medios de cultivo, GTE (glucosa-triptona-extracto de levadura) y el medio de referencia LB, encontrándose que la producción de proteínas Cry dependen tanto del medio de cultivo como de la cepa y que diferentes fuentes de nutrientes pueden afectar la velocidad de síntesis de las δ -endotoxinas y el tamaño de los cristales, (Carreras, 2005).

6.3 Análisis de diversidad genética de genes *cry* y *cyt* de *B. thuringiensis* con REP-PCR

La diversidad genética de *B. thuringiensis* se origina de la variedad de plásmidos en las cepas, de los mecanismos de transferencia por conjugación, de las secuencias repetidas semejantes a transposones que estarían flanqueando los genes de las endotoxinas, facilitando una alta frecuencia de reordenamientos en el DNA. La transferencia horizontal de plásmidos que codifican protoxinas puede conducir a producir cepas con dos inclusiones cristalinas diferentes.

B. thuringiensis es una bacteria estrechamente relacionada con *B. anthracis* (agente del ántrax) y *B. cereus* (patógeno oportunista del humano). El descubrimiento de la actividad biocida de *B. thuringiensis*, sobre larvas de muchos lepidópteros sugirió su uso potencial en el control biológico de insectos plaga y más adelante el hallazgo de *B. thuringiensis israelensis* (1978) capaz

de matar mosquitos, amplió su margen de utilidad en el control de insectos vectores de enfermedades de interés en salud pública. En las siguientes décadas nuevas subespecies fueron descubiertas, encontrándose una gran diversidad, las cuales en un principio fueron caracterizadas por su serotipo H flagelar, en más de 45 serotipos y 58 serovariedades (Schnepf *et. al.*, 1998).

El serotipaje ha sido la técnica mejor conocida para identificar y caracterizar cepas de *B. thuringiensis*, habiéndose identificado 69 serotipos y 82 variedades serológicas (Xu *et. al.*, 2006), sin embargo presenta algunas restricciones, como la incapacidad de procesar cepas no flageladas y diferenciar cepas de *B. thuringiensis* de algunas *B. cereus*, impidiendo encontrar relaciones filogenéticas entre los serotipos. Debido a las incongruencias y discrepancias observadas con este método se han enfocado esfuerzos hacia el desarrollo de técnicas moleculares basadas en la diversidad de su genoma, técnicas como los PFGE, RFLP, AFLP, REP-PCR, ribotipificación y secuenciación de genes específicos, han mostrado diversos grados de eficiencia en la diferenciación de cepas, además de establecer posibles grupos filogenéticos. Versalovic *et. al.*, (1991), Lima *et. al.*, (2002), Peruca *et. al.*, (2008), Reyes-Ramirez, Ibarra (2005), Ibarra *et. al.*, (2003), Lyndsay *et. al.*, (2,003).

El análisis REP-PCR ha sido ampliamente usado en una variedad de especies bacterianas y no bacterianas para identificarlas, caracterizarlas y evaluar su diversidad (Reyes-Ramirez, 2005).

El polimorfismo de elementos repetitivos (REP-PCR fingerprint) es un método frecuentemente usado para tipificar bacterias (Versalovic, 1991) mediante el análisis de la distribución de secuencias de DNA repetitivas en diversos genomas procariontes. El análisis genético de estas secuencias puede revelar distancias y patrones específicos para especies. Las secuencias REP, específicamente, han sido utilizadas en diversos estudios, para clasificar y relacionar taxonómicamente especies de *B. cereus* y ayudar a aclarar la relación genética entre poblaciones de *B. cereus* y *B. thuringiensis* (Peruca, 2008), así como, para identificación de nuevos aislados de *B. thuringiensis*

(Lima, 2002). Se ha demostrado que esta técnica de REP-PCR es altamente discriminatoria, reproducible, rápida, fácil y capaz de identificar serotipos de *B. thuringiensis*, que puede convertirse en un procedimiento de caracterización (Reyes-Ramirez, 2005).

El análisis REP-PCR de las diversas cepas nativas evaluadas en el presente trabajo, muestran patrones de bandas distintivas, como se observa en el gel de agarosa (Figura N° 3), con resultados similares a los encontrados en otras investigaciones (Versalovic, 1991; Lima, 2002; Peruca, 2008).

El análisis de cluster representado en el dendograma de similaridad tanto de cepas nativas como estándares de *B. thuringiensis* (Figura N° 4) basado en los patrones REP, y evaluado con el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA, nos muestra, en general, tres grandes agrupamientos o clusters.

El primer grupo incluye a cepas nativas principalmente de Junín (Jun6, Jun7, Jun8, Jun12), Huaral 6 e Ica 7 y las cepas estándar HD-500 y Bti-WHO, relacionadas con actividad tóxica contra dípteros y lepidópteros.

El segundo grupo, el más grande y con mayor número de subgrupos, incluye además de Junín 3 y Huaral (Hua1, Hua2, Hua3, Hua7, Hua8, Hua13 y Hua14), cepas de Ica (Ica1, Ica6, Ica9, Ica12 e Ica14) y Cusco (Cuz4, Cuz7, Cuz8, Cuz9, y Cuz10) junto con las cepas estándar que forman el subgrupo HD-130/HD-263/HD-732 relacionadas con actividad biocida contra dípteros y lepidópteros, exceptuando las cepas HD-130 que por su contenido de gen *cry 8* puede ser tóxica para coleópteros (Ibarra *et al.*, 2003), el subgrupo HD-73 relacionada con toxicidad frente a dípteros; y el subgrupo HD-1, relacionada con lepidópteros principalmente, pero también tendría actividad frente a mosquitos (Thomas *et al.*, 2001).

El tercer grupo incluye a cepas nativas principalmente de Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa y Cajamarca, y las cepas estándar HD-968 y GM33, relacionadas con actividad frente a una variedad de insectos, existiendo la

particularidad de que el subgrupo más grande sólo está conformado por cepas nativas, las cepas Are1 y Hua5 son las más disímiles entre ellas, y las cepas Jun1 y Jun9 son muy similares así como Ica11, Cuz6 y Hua4, y Cuz3 y Jun10. La cepa Hua10 (Huaral) es la que más se aleja en similitud de las cepas nativas estudiadas conformando una sola rama aislada de los tres grandes agrupamientos.

En general, utilizando el análisis REP-PCR, en el presente trabajo se observa una gran diversidad de las cepas nativas de *B. thuringiensis* procedentes de diferentes lugares de Junín, Huaral, Ica, Cusco, Arequipa y Cajamarca, con cierta tendencia a formar subgrupos según procedencia geográfica y en relación de similitud con las cepas *B. thuringiensis* estándares, tal como se reportan en otros trabajos de América (Ibarra *et. al.*, 2003; Reyes- Ramirez & Ibarra, 2005; Sauka *et. al.*, 2010).

B. thuringiensis constituye una especie genéticamente diversa. El uso de secuencias de DNA repetitivas, tal como REP para clasificación bacteriana sigue siendo útil y ofrece una alternativa para tipificar cepas de *B. thuringiensis* y para reconocer las relaciones filogenéticas entre subgrupos, comparando la posible similitud genética entre diferentes genomas bacterianos (Versalovic *et. al.*, 1991; Peruca *et. al.*, 2008). En esta investigación con cepas peruanas se ha podido correlacionar la similitud según procedencia geográfica.

El uso de secuencias de DNA repetitivas, tal como REP para clasificación bacteriana se está haciendo frecuente y ha permitido la comparación de posible similitud genética entre genomas bacterianos diferentes (Versalovic *et al.*, 1991) y nosotros lo incluimos en este trabajo con la idea de ayudar y complementar la caracterización de cepas de *B. thuringiensis* peruanas, nosotros podemos comparar los resultados obtenidos con otras características de *B. thuringiensis* que se conocen como la forma de cristal (Ibarra *et. al.*, 2003; Flores *et. al.*, 2010) pero sobre todo por el contenido de genes, lo cual nos permite identificar preliminarmente la actividad y el potencial larvicida que presentan las cepas nativas.

En general, utilizando los marcadores moleculares REP, se observa una gran diversidad de las cepas nativas de *B. thuringiensis* procedentes de diferentes lugares del país, con cierta tendencia a formar subgrupos según procedencia geográfica y en relación de similitud con las cepas *B. thuringiensis* estándares.

6.4 Análisis de los genes *cry* y *cyt* de *Bacillus thuringiensis*

Las proteínas o δ -endotoxinas son codificadas por genes *cry* y una cepa de *B. thuringiensis*, puede contener uno o más genes *cry*. Uno de los métodos más empleados para la caracterización molecular de genes es el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es una técnica sensible para detectar secuencias de interés. Mediante esta técnica se pueden amplificar secuencias de ADN en cantidades suficientes para detectarlas mediante electroforesis. En el presente estudio analizamos el contenido de genes *cry* y genes *cyt* en DNA plasmídico extraído de las 55 cepas nativas seleccionadas; esto se efectuó amplificando con cebadores universales para los genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry8*, *cry11*, *cyt1* y *cyt2*; se pudo detectar la presencia de éstos en las cepas aisladas, obteniéndose en muchos casos productos del tamaño esperado como puede observarse en la Tabla N° 3.

Aunque en la práctica, la actividad insecticida de una cepa de *B. thuringiensis* se puede evaluar mediante pruebas de toxicidad (Tabla 13, ensayo biológico) con el insecto de interés, el montaje de dichas pruebas es dispendioso, lento y costoso. La amplificación de los genes *cry* del *B. thuringiensis* por medio de la PCR, ha permitido clasificar y seleccionar cepas de acuerdo con el tipo de gen *cry* que contienen; ello sirve para predecir su actividad biológica potencial, fase preliminar en los ensayos de toxicidad contra insectos susceptibles. De esta manera se puede reducir el número de cepas que se van a evaluar en las pruebas finales de toxicidad, y se ahorran recursos y tiempo; aumenta la probabilidad de identificar en menor tiempo, nuevas cepas con mayor espectro de acción para el control de plagas y/o cepas más tóxicas y ventajosas que las que se conocen y comercializan actualmente; dichas cepas se podrían usar en la producción de bioplaguicidas más efectivos

o, mediante ingeniería genética, para la producción de resistencia a plagas en organismos transgénicos (Hernández *et al.*, 1997).

La mayoría de cepas de B. thuringiensis, contienen varios DNA plasmídicos, circulares y lineales cuyos tamaños varían de 2 kb a más de 200 kb. (Carlton & González 1985). Ellos constituyen el 20% del total del DNA (Aronson, 2002). Los genes *cry* que codifican las proteínas cristal están principalmente localizados en plásmidos grandes (Li *et al.*, 1991). Las especies y subespecies de *B. thuringiensis* contienen una gran variedad de elementos transponibles, que incluyen secuencias de inserción y transposones (Mahillon *et al.*, 1994). Se ha postulado que participarían en la amplificación de genes *cry* en la célula, o de mediadores de la transferencia de plásmidos (Schnepf *et al.*, 1998). Muchas cepas de *B. thuringiensis*, pueden contener múltiples genes *cry* a menudo flanqueados por transposones o secuencias de inserción, motivo por el cual las cepas pueden sintetizar más de una proteína cristal. Esta diversidad es debida a la transferencia de plásmidos entre cepas de *B. thuringiensis* (Thomas *et al.*, 2001).

Cuando amplificamos con DNA genómico observamos que dos cepas nativas amplificaron con el primer universal *cry1*, las cepas Hua7 y Cuz8, las que también amplifican con DNA plasmídico; 3 cepas de *Bacillus thuringiensis*: amplificaron con primer general *cry11*, donde dos eran cepas usadas como control positivo y dos eran nativas, Ica8 y Are1, estas cepas también dieron un producto esperado con DNA plasmídico. Se ha informado de la existencia de genes *cry* insertados en el cromosoma de *B. thuringiensis* (Sauka & Benintende, 2008). Se ha descrito en la literatura la detección de genes *cry* del grupo I, II y V, DNA cromosomal y plasmídico, usando la técnica de PCR. Poojitkanon *et al.*, 2008.

En las figuras de los geles de agarosa, cuando se observa el perfil genético presente en las cepas aisladas, se puede apreciar que la mayoría de las cepas presentan más de una familia de genes *cry* simultáneamente, solamente en 12 cepas observamos que contenían 1 tipo de gen, 40 cepas contienen más de 1 tipo de gen *cry* o *cyt*, en las cuales 16 cepas aisladas

contienen dos genes diferentes, 14 aisladas contienen 3 genes diferentes, 7 cepas contienen 4 genes diferentes, dos cepas contienen 5 genes diferentes y 1 cepa contiene 6 genes diferentes, 3 cepas no amplificaron con ninguno de los *primers* ensayados. Martínez *et. al.*, (2004) trabajando la caracterización molecular y biológica de una cepa de *Bacillus thuringiensis* subespecie *aisawai*, encontró no solo que la cepa contenía hasta 8 genes *cry* diferentes: 5 variedades de *cry1*, *cry2*, *cry9Ea1* y un nuevo tipo de gen el *cry11*, sino un amplio espectro de actividad contra lepidópteros y dípteros.

Los resultados obtenidos nos indican que en el grupo de cepas estudiadas hay una gran cantidad de cepas que presentaron el gen *cry 2* que equivale a un 91%, el 45.5% contenían el grupo de genes *cry1* y el 41.8% presentaba el gen *cry4*; comparándolos con los otros genes en estudio. Los grupos que se presentan en menor cantidad en estas cepas analizadas son el grupo del *cry 8* con 5.5% y *cry11* con 10%; los genes con actividad citotóxica *cyt 1* y *cyt 2* en este grupo estudiado constituyen el 25.5 y el 16.4 % respectivamente. Nuestros resultados difieren de otros encontrados, por ejemplo en México, Soberón (2007), reporta que el gen *cry1* sería el más abundante representando el 49%, mientras que las cepas que contenían *cry11* y *cyt* el 8% y las que contenían *cry8* fueron muy pocos.

El DNA plasmídico extraído de 55 cepas fue amplificado con el primer general para el gen *cry1*, obteniéndose 25 aislados positivos para *cry1* y un producto de tamaño esperado de un promedio de 550 pb. Del total de cepas estudiadas 50 fueron *cry2+*, los amplificados dieron bandas muy nítidas de aproximadamente 700 pb, de acuerdo a lo esperado; 23 cepas amplificaron con *cry4* y dieron un producto esperado de alrededor de 700 pb, 3 aislados contienen el gen *cry 8* que amplificó una banda de 370 pb, 5 cepas amplificaron *cry11* con 300 pb, y los genes citotóxicos *cyt 1* y *cyt 2* amplificaron un producto de alrededor de 525 pb, los que se encontraron en 14 y 9 cepas nativas respectivamente, tal como se observa en la Tabla N° 3.

También es importante mencionar que en algunas cepas se ha observado que las bandas son más intensas que otras, estas diferentes intensidades

podrían estar relacionadas a la presencia de subgrupos en ella que no pueden diferenciarse con el uso de primers universales, también podría deberse a que en estas cepas el número de plásmidos es menor o quizá a una diferencia en la cantidad del DNA en la muestra, a pesar de haber sido cuantificado.

Amplificación diferencial se puede explicar por una abundancia de copias del mismo gen y/o por una mayor estabilidad de la hibridación del par de oligonucleótidos frente a la secuencias homólogas del gen respectivo, ello a su vez, se puede derivar del tamaño y el contenido de bases G y C de cada oligonucleótido. (Hernández *et al.*, 1997).

Los parámetros que se tuvieron en cuenta para asegurar condiciones apropiadas de las reacciones de amplificación de los genes *cry*, fueron los siguientes: 1. Método de extracción y concentración del DNA del *B. thuringiensis*; 2. Prueba de especificidad y concentración de oligonucleótidos; 3. Prueba de concentración de MgCl₂ y Taq-DNA-polimerasa; y 4. Ensayos con diversas temperaturas de hibridación y programas de amplificación. Extracción y concentración del DNA del *B. thuringiensis*. La calidad y concentración del DNA bacteriano constituyen indicadores cruciales que son necesarios conocer para implementar, de manera óptima, reacciones de amplificación mediante la PCR.

En todos los casos el análisis de PCR ha sido realizado utilizando *primers* universales, los cuales debían dar un producto o amplificado de un tamaño determinado, sin embargo no ha sido así; algunas cepas además de producir el producto esperado, amplificaban otros de diferentes tamaños, lo que podría deberse a la existencia, a la complejidad genética de *Bacillus thuringiensis*, estas cepas pueden contener diferentes subgrupos del gen *cry* que comparten homología con los cebadores, los que tendrían que confirmarse utilizando primers específicos; podría también tratarse de genes potencialmente nuevos. En este estudio 3 cepas no amplificaron para ninguno de los oligonucleótidos probados, podrían tratarse de cepas cuyo contenido de genes fuera diferente al de los ensayados o quizá con un contenido de genes nuevos, toda vez que se trataría de una cepa que produjo el cristal proteico, por lo que estas cepas son

candidatas a contener genes *cry* nuevos y con la potencialidad de matar a otros insectos (Bravo *et al.*, 1998).

De acuerdo a nuestros resultados, las cepas analizadas contienen un número bastante alto de genes *cry*, como lo demuestra el perfil mostrado en los geles de agarosa, lo que estaría relacionado con la diversidad que presenta nuestra ecología, para ello se tendría que analizar mayor número de cepas e incluir otras regiones del país que no se han trabajado en este estudio, como por ejemplo las zonas tropicales; encontramos al gen *cry2* como el más abundante, 90,9%, seguido de los genes *cry1* con un 45% y el gen *cry4* con 42%; sin embargo se ha reportado que los genes *cry* más comunes que se han encontrado en la naturaleza son del grupo del *cry1*, (Porcar & Juárez-Pérez, 2002; Bravo *et al.*, 1998; Ben-Dov *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2003).

En un estudio realizado en 94 cepas venezolanas, se encontró que el perfil genético *cry1/cry2* era el más abundante, que la familia *cry1* estaría presente en el 76% y *cry 2* en el 71% de las cepas *B. thuringiensis* aisladas, (Gillis & Santana, 2007). Apaydin (2004) reporta al gen *cry1* como el segundo grupo más abundante que encuentra en su estudio al igual que nosotros y menciona que Bravo reportó en 1998 al gen *cry3* como el más alto en su colección de cepas mexicanas, mientras que las colecciones de Taiwán (Chak *et al.*, 1994) y de Israel (Ben-Dov *et al.*, 1997) no contenían *cry3*, estos dos estudios sugieren que estas colecciones de Asia carecían de gen *cry3*, sin embargo Apaydin encuentra el gen *cry 3* en el 16% de sus cepas.

Respecto al gen *cry4* Apaydin (2004) reporta su presencia en el 18% de sus aislados; Bravo *et al.*, (1998) lo detecta en el 8% de cepas de suelo mexicano; sin embargo Chak *et al.* (1994), detectan este gen en solo 4 de 536 aislados de suelo de Taiwán, mientras que en el presente trabajo lo encontramos en el 42% de nuestras cepas estudiadas, ocupando el tercer lugar, respecto a otros genes más frecuentes..

Se ha descrito que el gen *cry2* fue encontrado más frecuentemente en cepa aisladas de Asia (Chak *et al.*1994); Kim *et al.*, (2000) y Zhang *et al.*,

(2000) que de América Latina. Wang *et al.*, (2003) encontraron que el 70% de sus cepas aisladas en China contenían gen *cry2*, pero Apaydin (2004) encontró que el gen *cry2* estaba constituyendo el 15% de sus cepas, nuestro estudio encontró en el 91% de los aislados siendo el más abundante y el gen *cry1* en segundo lugar con un 45%.

Zhu *et al.*, (2009) en un estudio realizado en Sichuan – China, basado en el método del PCR-RFLP, encuentra 66% de cepas que contienen *cry1* con 21 combinaciones diferentes para *cry1*, siendo las cepas que contienen *cry2* las segundas más abundantes con un 39.5%; además reporta el hallazgo de nuevos haplotipos de genes *cry*, designados como *cry52Ba1*, *cry54Aa1*, *cry30Fa1*, los resultados obtenidos revelarían la diversidad y particularidad de las fuentes de las cepas de *B. thuringiensis* en su país.

Los genes *cry1* codifican para proteínas que son activas contra lepidópteros, mientras que los genes *cry2* codifican para toxinas contra lepidópteros y dípteros y el gen *cry 4* para dípteros y coleópteros; tomando en cuenta este concepto, nuestros resultados respecto a la identificación de genes *cry* por PCR indicarían que podríamos tener cepas con actividad larvicida para insectos plaga de mosquitos vectores de enfermedades en humanos y polillas plaga de cultivos de interés agronómico, potenciales biocontroladores de dípteros, coleópteros y lepidópteros . Por ello su caracterización puede representar una solución para algunas de las enfermedades metaxénicas que prevalecen en el país, ya que muchas de éstas son transmitidas por mosquitos (dípteros). En este sentido, al emplear estas cepas de *Bacillus thuringiensis* como método de biocontrol para los vectores de enfermedades como por ejemplo, dengue, malaria y fiebre amarilla evitaría o disminuiría el uso de insecticidas químicos que no son selectivos y que son tan perjudiciales para la salud y el medio ambiente, se ataca específicamente al insecto vector y no se afecta a otros insectos pertenecientes a diferentes familias.

Además, los perfiles genéticos obtenidos en las cepas *B. thuringiensis* aisladas son activos para Lepidópteros, los cuales representan una familia de insectos que atacan numerosos cultivos agrícolas de interés nacional

ocasionando grandes pérdidas económicas. Por ello el uso de preparaciones de cristales de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas podrá representar un método de biocontrol alternativo para la protección del medio ambiente, de los cultivos agrícolas y forestales y para controlar enfermedades como el dengue que afecta de la salud de las personas y que en nuestro país a pesar de arduas campañas de control y prevención que realiza el MINSA, aun no las han podido controlar y menos erradicar. Otra de las aplicaciones de los genes *cry* es la introducción de éstos en cultivos de importancia económica, con la finalidad de que las plantas expresen estas proteínas.

En la actualidad se ha incrementado en gran medida a nivel mundial los cultivos de plantas transgénicas que expresan proteínas Cry (Bravo & Ceron, 2004; Vanegas, 2009). Sin embargo, antes de la aplicación de estas cepas *B. thuringiensis* como agente de biocontrol se requiere estudios previos donde se evalúe la actividad insecticida de estas cepas sobre los insectos de interés en el ecosistema.

6.5 Secuenciamiento de genes *cry* y genes *cyt*

El análisis BLASTN indicó que el 92% de las muestras secuenciadas se correspondían con sus respectivos genes amplificados aunque el tamaño del amplificado no era el esperado, sobre todo para las cepas que contenían genes *cry2*, donde el producto de PCR esperado era de 700 pb y en el secuenciamiento da 403 pb; respecto a los demás genes, para *cry4* se esperaba un producto de 400 pb y dio 322 pb; *cry11*, 300 pb y dio dos tamaños 232 pb para las cepas HD-500 y Jun3, las cuales coincidían con *cry4D* y 342 pb para las cepas Are1 e Ica13, en la cuales el alineamiento dio como resultado que coincidía con un fragmento de *E. coli*, lo que podría indicar contaminación de la muestra o una mutación. Para las cepas con genes citotóxicos *cyt1* y *cyt2* se espera un amplificado de 500 pb y el BLASTN dio 352 pb. Las cepas de *cry1* y *cry 8* estaban muy sucias no pudieron alinearse debido a la presencia de múltiples fragmentos.

En el caso de la cepa Cuz15, se ha podido encontrar que podrían pertenecer a la variedad *cry 2Ab* con un 99% de identidad y las cepas *cyt 2* coinciden con *cyt 2Ba*, excepto la cepa Jun 12 cuyo fragmento amplificado no coincidió con el gen *cyt 2* ni con ningún otro conocido, esto podría hacernos pensar en la posibilidad de estar frente a una nueva variedad aun no reportada y cuya secuencia tampoco estaría representada en la base de datos del DNA, ya que es una cepa que presenta esporas.

Las diferencias encontradas en el tamaño de la región secuenciada, podrían indicar que se trataría de otra variedad del gen en estudio, cuyo tamaño también podría indicar una proteína diferente en estructura y función, es decir con una actividad tóxica diferente, mayor o menor, como se señala en Ibarra *et al.*, 2003. Este hecho podría explicar la poca y baja actividad tóxica de las cepas ensayadas en el presente trabajo, cuando se enfrentaron a larvas de *Aedes aegypti*.

Hemos encontrado cepas que presentan una variedad de combinaciones de genes, (Tabla N° 12), lo que ha sido reportado para algunas combinaciones de genes *cry* y *cyt* como las más efectivas en su actividad mosquitocida (Schnepf *et al.*1998).

Creemos que el hecho de que algunas de las cepas no se pudieran alinear y presentaran múltiples fragmentos se podrían deber a modificaciones de las cepas en su manipulación, contaminación por ejemplo o problemas desde el inicio con la purificación, en los amplificados de cepas como Caj1 e Ica10, las bandas eran delgadas y no tan brillantes como la demás, lo que podría estar indicando poca cantidad de DNA.

Los resultados obtenidos de la amplificación por PCR y el secuenciamiento nos han permitido identificar dos cepas que coinciden en mostrar para las cepas con código Caj 1 e Ica 10, su correspondencia con el contenido de genes *cry 2* y *cry 4* en ambas y además *cyt 2* en Caj1; la presencia de los genes *cry2* y *cry 4* corrobora su actividad contra *Aedes aegypti*, encontrada en los bioensayos y por otro lado estaríamos identificando dos cepas con

contenido diferente de genes pero con la misma actividad entomocida. La cepa de Cajamarca da un perfil de proteínas con bandas bien teñidas de 97 y 75 kD las que coinciden con cepas estándar mejicanas usadas como control positivo, estas masas moleculares generalmente se corresponden con *cry 2* que forma cristales cuboidales y formas irregulares (Rosales *et al.*, 2003; Carmona A. 2002; Crickmore, *et al.*, 1998).

Creemos que debemos ampliar el estudio con mayor número de cepas.

6.6 Bioensayo de entomotoxicidad de *B. thuringiensis*

Para la caracterización molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* es importante contar con un sistema que permita la identificación de cepas que porten proteínas e identificar a las toxinas que puedan destruir organismos de interés, ya sea en el campo agrícola, forestal o a nivel de salud. A la fecha han sido muchos los sistemas evaluados, tales como pruebas de inmunoensayo (ELISA), método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que hemos empleado en el presente estudio, PCR-RFLP, AFLP, pruebas de hibridización usando sondas de DNA (Southern blott), inmunoquímica y bioensayos. Benintende *et al.*, 2000.

La búsqueda de cepas de *B. thuringiensis* con actividad entomotóxica por medio de bioensayos es un proceso que requiere de mucho cuidado, las condiciones de trabajo deben ser bien controladas, temperatura y humedad, es costoso ya que implica el uso de dieta para las larvas y es largo porque hay que trabajar por triplicado y hacer observaciones de letalidad a las 24, 48, 72 horas.

En el presente estudio el bioensayo preliminar realizado sobre larvas del III estadio de *A. aegypti*, permitió determinar cualitativamente la toxicidad de 5 cepas de un total de 38 analizadas, dos nativas y tres estándar. Se partió de una muestra liofilizada del complejo espora cristal, para controlar mejor la concentración. Los resultados obtenidos nos muestran que habríamos trabajado con cepas de baja toxicidad, dado que el estándar HD-500 dio

positivo a las 24 horas con 100% de mortalidad de larvas de Chulucanas y las cepas nativas Caj1, Ica10 dieron 92 y 84% de mortalidad pero a las 72 horas de inoculada la cepa a las larvas procedentes de Trujillo. Las restantes cepas probadas no mostraron ninguna actividad en las condiciones ensayadas.

La toxicidad presentada por estas cepas nativas estaría relacionada con la presencia de genes *cry 2* en ellas como se observan en los geles de agarosa Figura N° 5b y 5e. Se ha descrito que la variabilidad de toxicidad de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* a los diferentes grupos taxonómicos de las larvas de insectos se debe a los diferentes mecanismos que conducen a la activación de los cristales paraesporales y a las variadas condiciones del intestino de los insectos. (Baró et al., 2009)

Es importante subrayar que la susceptibilidad de una especie de lepidóptero a las toxinas de *B. thuringiensis*, depende directamente del tipo de toxinas que contenga cada cepa, ya que se sabe que existe una enorme diversidad de proteínas Cry, con más de 250 diferentes genes que las codifican (Del Rincón-Castro *et. al.*, 2006).

El mecanismo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* involucra la solubilización del cristal en el intestino medio del insecto. Para la mayoría de los lepidópteros las protoxinas son solubilizadas bajo condiciones alcalinas y enzimas específicas, las cuales pueden variar según el organismo susceptible. Las diferencias en el grado de solubilidad explica la variabilidad en la toxicidad entre las proteínas Cry, (Crikmore *et al.*, 2000).

La presencia de ciertas toxinas puede potenciar la actividad de otras, o provocar uniones no productivas. Queda claro que la interacción es específica para el insecto, lo que puede reflejar diferencias en las afinidades del receptor para cada toxina. Debido a esto la unión de las endotoxinas a sus receptores es fundamental para la toxicidad (Del Rincón-Castro *et. al.*, 2006).

Este tipo de proteínas encontradas en las cepas peruanas presentan comúnmente actividad toxica contra larvas de Dípteros como *Aedes aegypti* y además este insecto es vector de una enfermedad como el Dengue que constituye un problema de salud actual considerando sobre todo que el vector tiene tendencia a dispersarse.

Se ha descrito una correlación positiva entre el efecto tóxico de una cepa de *B. thuringiensis* y el desarrollo de larvas. Sin embargo existen cepas que no tienen efecto marcado sobre la mortalidad, pero si sobre el desarrollo de las larvas, lo que traería como consecuencia menor viabilidad y un deterioro de la población del insecto para la próxima generación, esto puede tener implicancias importantes desde el punto de vista del manejo de resistencia hacia *Bacillus thuringiensis*. Una estrategia para retardar la aparición de resistencia se basa en el uso de dosis subletales que retardan el crecimiento del insecto (León & Ibarra ,1995).

VII. CONCLUSIONES

1. Se han caracterizado bioquímica y molecularmente 55 cepas peruanas de *Bacillus thuringiensis*, a partir de muestras de suelo, de los departamentos de Junín, Lima (Huaral), Cuzco, Ica, Cajamarca, Arequipa, Chiclayo y Tacna; dos de ellas Ica10 y Caj1 con actividad larvicida para díptero.
2. Las cepas estudiadas contienen una mezcla de endotoxinas, con proteínas entre 36 y 116 kD. Otras de 97 kD y 70 kD como las cepas de Cajamarca, Arequipa y Chiclayo las que corresponderían a Cry2. Algunas cepas presentan bandas de 130 kD que corresponde a Cry 1,
3. El dendograma del REP-PCR dió 3 grandes grupos, que en algunos casos se asocia a su procedencia, como en el grupo 1, pero la diversidad de fragmentos podría deberse a los subgrupos del gen *cry*.
4. Del total de cepas analizadas 12 tiene un solo gen *cry* y 40 contienen más de un tipo de gen *cry*.
5. El gen *cry 2* está presente en el 91% de las cepas peruanas estudiadas, seguido de *cry1* (45%) y *cry4* (42%) lo que significa que las cepas tendrían actividad entomocida contra dípteros, principalmente.
6. 62 de 67 muestras analizadas, confirmaron su contenido de genes *cry*
7. La cepa Cuz5, por homología de secuencia, con 99% de identidad se confirma que es *cry2Ab*.
8. Los bioensayos, mostraron actividad tóxica para *Aedes*, en tres estándares: *B thuringiensis* var. *israelensis* HD-500, *B thuringiensis* var. *aisawai* HD-130 y *B thuringiensis* var. *kurstaki* HD-263, las tres contienen genes *cry 2*, *cry 4* y *cyt*, tóxico para dípteros.
9. Mediante la aplicación de la técnica de PCR se identifica en la cepa Ica10, los genes *cry 2* y *cry4*. La cepa Caj1, contiene genes: *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry8* y *cyt2*.
10. Los resultados obtenidos han permitido caracterizar molecularmente cepas de *Bacillus thuringiensis* peruanas con la finalidad de aportar con el desarrollo biotecnológico, que resuelva problemas básicos y

aplicados en el campo del uso de bioinsecticidas para el control de plagas y vectores.

11. Las cepas caracterizadas podrían desarrollarse en el futuro como bioinsecticidas alternativos para el control de plagas que representan un problema importante en algunos cultivos y en diferentes regiones del Perú, así como para el control de vectores de enfermedades que son un problema de salud, como el Dengue, la Malaria, entre otras.

VIII RECOMENDACIONES

- 1.- Es necesario ampliar el estudio con mayor número de muestras que sean colectadas en otras regiones del País y otros hábitats, para conocer la distribución de la bacteria en un ambiente tan diverso como lo es nuestro País.
- 2.- Establecer una colección de cepas de *Bacillus thuringiensis* en el Perú, ya que por su ubicación geográfica y por las ecoregiones variadas que presenta, tendría cepas nuevas con potencial actividad entomocida, o entomopatógena.
- 3.- Recomendamos incrementar y apoyar las investigaciones sobre *B thuringiensis*, por sus potenciales aplicaciones en los campos de la salud, agricultura y medio ambiente.
- 4.- Realizar la caracterización genética utilizando *primers* específicos, para identificar a nivel de subespecies.
- 5.- Variar las condiciones de cultivo, para obtener aislados de *Bacillus thuringiensis* con alta actividad insecticida para producir proteínas cristal a gran escala y aplicarla para biocontrol.
- 6.- Realizar experimentos de clonación en *E. coli* con vectores adecuados para producir proteínas en forma rápida y económica.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agaisse H. and D. Lereclus. 1995. How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein? Minireview. Journal of Bacteriology. 6027-6032.
2. Akiba T.; Y. Abe; S. Kitada; Y. Kusaka; A. Ito; T. Ichimatsu; H. Katayama; T. Asao; K. Higuchi; E. Mizuki; M. Ohba; R. Kanai; K. Harata. 2004. Crystallization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic activity against human cells. Act. Cryst. D60:2355-2357.
3. Al-Banna, Khyami-Horani. 2004. Nematicidal Activity of two Jordanian strains of *Bacillus thuringiensis* on root-knot nematodes. Nematol. Medit. 32:41-45.
4. Alpey N; MB. Bonsall; L. Alpey. 2009. Combining pest control and resistance management: synergy of engineered insects with *B t* crops. J Econ Entomol. Apr; 102(2):717-32.
5. Apaydin, O. 2004. Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains from Different Grain Habitats. Tesis para optar el Grado de Master of Science. Izmir Institute of Technology. Izmir, Turkey. October.
6. Armengol G; M. Escobar; M. Maldonado; S. Orduz. 2007. Diversity of Colombian Strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against Dipteran and Lepidopteran insects. J Appl Microbiol. 102:77-88.
7. Aronson A. and A. Shai. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiol. Lett. 195:1-8.
8. Backeljau T; L. De Bruyn; H. De Wolf; K. Jordaens; S. Van Dongen; B. Winnepennincks. 1996. Multiple UPGMA and neighbor-joining trees and the performance of some computer packages. Mol Biol Evol. 13(2):309.
9. Baró Y; D. Fontana; R. Dos Santos. 2009. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Fitosanidad. 13(3):187-192.

10. Bechtell y Bulla. 1976. Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis*. Journal of Bacteriology. 127(3):1472-1481.
11. Ben-Dov E; A. Zaritsky; E. Dahan; Z. Barak; R. Sinai; R. Manasherob; A. Khamraev; E. Troitskaya; A. Dubitsky; N. Berezina; Y. Margalith; 1997. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 63:4883–4890.
12. Benintende G; J. López-Meza; J. Cozzi; C. Piccinetti; J. Ibarra 2000. Characterization of INTA 51-3, a new atypical strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina. Curr Microbiol. 41(6)396-401.
13. Bravo A.; S. Sarabia; L. Lopez; H. Ontiveros; C. Abarca; A. Ortiz; M. Ortiz; L. Lina; F. Villalobos; G. Peña; M. Nuñez; M. Soberón; R. Quintero. 1998. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. APPL. Environ. Microbiol. 64(12):4965–4972.
14. Broderick N.; K. Raffa; J. Handelsman. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc Natl Acad Sci USA. 103:15196-9.
15. Brookes G.; P. Barfoot. 2006. GM crops: the first ten years - global socio-economic and environmental impacts. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). 36. Ithaca NY, USA.
16. Carlson C.; A. Kolsto. 1993. A complete physical map of *Bacillus thuringiensis* chromosome, Journal of Bacteriology. 175:1053-1060.
17. Carlson C.; D. Caugant; A. Kolsto. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 60(6):1719-1725.
18. Carlton B and J Gonzáles. 1985. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. The Molecular Biology of the *Bacilli*. Edit. D A Dubnau, (Academic Press, New York). P. 211-249.
19. Cámara JM.; A. Martínez; L. Calderón; M. Fernández de Lezeta; P. Miralles 2009. Manual de Prevención y Gestión de Plagas para la Industria Hotelera. Prevención y Control de Plagas/Vectores Ciudad de Madrid.

20. Carmona A. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *Bioagro*. 14(1): 3-10.
21. Carreras B.; A. Bravo; J. F. Sánchez. 2004. Caracterización molecular de cuatro cepas de *Bacillus thuringiensis*. Relación con su actividad biológica. *Rev. Protección Veg.* 19(2):80-85.
22. Carreras B. 2005. Cuantificación por Densitometría de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*. *Fitosanidad*. 9(1):43-46. Disponible en internet: <http://www.redalyc.org/pdf2091>
23. Carreras B.; S. Rodríguez; O. Ancheta; T. Valdés; Y. Harvey. 2008. La morfología de los cuerpos paraesporales y su relación con la actividad biológica en cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(2):105-108.
24. Carrera M. 2009. Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/tesis> de grado de doctor. Ecuador.
25. Carreras B.; B. Rodríguez. 2009. Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Drosophila melanogaster maengi*. *Fitosanidad*. 13(2):83 - 87
26. Carreras B. 2011. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12(2):129 -133.
27. Castro J.; I. García; D. Neyra. 1996. Eficacia del *Bacillus sphaericus* en criaderos naturales de mosquitos en zonas de alto riesgo de malaria. *Rev. Per. Epidemiol.* 9(2):18-23.
28. Castro J.; D. Nongrados; C. Mariños. 1999. Evaluación del *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de mosquitos en Loreto, Perú. *Rev. Per. Ent.* 41:91-95.
29. Cerón J.; A. Ortiz; R. Quintero; L. Guereca; A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11):3826–3831.

30. Çetinkaya F. 2002. Master of Science Thesis. Isolation of *Bacillus thuringiensis* and Investigation of Its Crystal Protein Genes. İzmir Institute of Technology.
31. Chak F.; D. Chao; M. Tseng; S. Kao; S. Tuan; T. Feng. 1994. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2415–2420.
32. Crickmore N.; D. Zeigler; J. Feitelson; E. Schnepf; J. Van Rie; D. Lereclus; J. Baum; D. Dean. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
33. Delgado J. 2011. “Aislamiento y Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad mosquitocida nativas de Oaxaca” TESIS para optar el grado de Maestro en Ciencias, IPN – CIIDIR – OAXACA, México.
34. Díaz M. 2006. Proteasas digestivas de tipo tripsina del taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides* (Lepidóptera: Noctuidae): Caracterización e interacción con la proteína insecticida Cry1Ab. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Departamento de Biotecnología.
35. Dulmage H. 1973. *Bacillus thuringiensis* U.S. assay standard. Report on the adoption of a primary US reference standard for assay formulation containing the delta-endotoxin of *B thuringiensis*. *Entomol. Soc. Amer.* 19:200-202.
36. Estruch J.; G. Warren; M. Mullins; G. Nye; J. Craig. 1996. Vip 3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against Lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5389-5394.
37. Feitelson J.; J. Payne; Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology.* 10:271–275.
38. Flores A, J. Woolcott; R. Egusquiza; A. Patiño; D. Huerta; F. García. 2010. Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* patotipos II y IV y *Bacillus sphaericus* aislados de suelos agrícolas peruanos. *Biotempo.* 10: 57-70.
39. Flores A; R. Egusquiza; M. Alcarraz; J. Woolcott; E. Benavides, J. Godoy; D. Huerta; Yisella Jesus; A. Patiño; 2011. Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* Aislados de Agroecosistemas Peruanos y evaluación del

- Potencial Bioinsecticida. Ciencia e Investigación. 14(1):29-34. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM.
40. Gillis A.; M. Santana. 2007. Detección de genes *cry1* y *cry2* en cepas venezolanas de *Bacillus thuringiensis* y sus posibles aplicaciones en el campo de la Biotecnología Agrícola. IFMBE Proceedings. 18:975-978.
 41. Gómez I.; D. Oltean; S. Gills; A. Bravo; M. Soberón. 2001. Mapping the Epitope in Cadherin-like Receptors Involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxin Interaction Using Phage Display. The Journal of Biological Chemistry. 276 (31): 28906-28912.
 42. Gonzáles A.; R. Díaz; M. Díaz; Y. Borrero; R. Bruzón; B. Carreras; R. Gato. 2011. Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) 59 (3): 1007-1016, September.
 43. Guerchicoff A.; R. Ugalde; C. Rubinstein. 1997. Identification and Characterization of a Previously Undescribed *cyt* Gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 63(7): 2716-2721.
 44. Guerchicoff A.; A. Delécluse; C. Rubinstein. 2001. The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. Appl. Environ. Microbiol. 67:1090-6.
 45. Guillet P.; D. Kurstack; C. Philippon; R. Meyer. 1991. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for onchocerciasis control in West Africa. 187-190. In H de Barjack and D. J. Sutherland (ed), Bacterial control of mosquitoes and blackflies, Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
 46. Hamouda T.; A. Shih; J.R. Baker Jr. 2002. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. Letters in Applied Microbiology. 34, 86–90.
 47. Helgason E.; O. Okstad; D. Caugant; H. Johansen; A. Fouet; M. Mock; I. Hegnal; A. KOLSTO. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. . Appl. Environ. Microbiol. 2627–2630.
 48. Herbers K.; U. Soewald. 1999. Production of new/modified proteins in transgenic plants. Plant biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 10:163-168.

49. Hercos F.; U. Gomes De Paula. 2008. Molecular characterization of the *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains 344 and 1644, efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 7(3):195-209.
50. Hernández J.; L. Mariño; M. Orozco; J. Narvaez. 1997. Uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para caracterizar aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Corpoica*. Vol 2. N° 1. Julio. p. 1-10.
51. Hodgman T.; Y. Ziniu; S. Ming; T. Sawyer; C. Nicholls; D. Ellar. 1989. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain which is toxic to the housefly *Musca domestica*. *FEMS Microbiology Letters*. 114(1):17-22.
52. Hofte and Whiteley. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, June 242-255.
53. Hu X.; B. Hansen; J. Eilenberg; B. Hendriksen; L. Smidt; Z. Yuan Z; G. Jensen. 2004. Conjugative transfer, stability and expression of plasmid encoding a *cry1Ac* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiology Letters*. 231:45-52.
54. Ibarra J.; C. Del Rincón; S. Orduz; D. Noriega; G. Benintende; R. Monnerat. L. Regis; C. de Oliveira; H. Lanz; M. Rodriguez; J. Sanchez; G. Peña; A. Bravo. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin American with Insecticidal Activity against Different Mosquito species. *Applied and Environ. Microbiol.* Sept. 69(9):5269-5274.
55. Ibarra J. 2003:1 Diversidad de *Bacillus thuringiensis* y su implicación en el rango de toxicidad. (Conferencia inaugural) Memorias del XXV Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Chilena de Entomología. Talca, Chile. 1. <http://entomología.otalca.cl/congreso/resumen.htm>
56. Iriarte J.; P. Caballero. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. *Bioinsecticidas, fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integral de plagas*. Phytoma-España. 15-44.
57. Kronstad J.; Schnepf; H. Whiteley. 1983. Diversity of Locations for *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Genes. *Journal of Bacteriology*. 154(1): 419-428.

58. Kumar S.; A. Chandra; K. Pandey. 2008. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *J. Environ Biol.* 9(5):641-53.
59. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature (London).* 227, 680-685.
60. Lecadet M M.; E. Frachon; C. Dumanoir V; H. Ripouteau; S. Hamon; P. Laurent; I. Thiery. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86(4):660-672.
61. Li J.; J. Carroll; J. Ellar D. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353:815–821.
62. Lima A.; A. Guidelli; I. Abreu; M. Lemos. 2002. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. *Genet Mol Biol.* 25(2) 225-9.
63. Llewellyn D., Y. Cousins; A. Mathews; L. Hartweck; B. Lyon. 1994. Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein genes in transgenic crop plants. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 49:85-93.
64. Loeza-Lara P.; G. Benintende; J. Cozzi; A. Ochoa-Zarzosa; V. Baizabal-Aguirre; J. Valdez-Alarcón; J. Lóopez-Meza. 2005. The plásmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. *Plasmid* 54, 229-240.
65. López M.; J. Ibarra. 1996. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology.* Apr.1306–1310.
66. Lu Y.; K. Wu; Y Jiang; Y Guo. N. Desneux. 2012. Widespread adoption of *Bt* cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Letter.* www.Nature.com/Nature. 2012. Macmillan Publishers Limited.
67. Lyndsay R.; P. Agron; K. Hill; P. Jackson; L. Ticknor; P. Keim; G. Andersen 2003. Genome Differences That Distinguish bacillus anthracis from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5) 2755-2764.

68. Maduell P.; G. Armengol; M. Llagostera; S. Lindow; S. Orduz. 2007. Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculums or distal plant part. *Journal of Applied Microbiology*. 103:2593-2600.
69. Maduell P. 2007. Estudio de la Ecología de *Bacillus thuringiensis* en la hoja. Memoria presentada para obtener grado de Doctor. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Genética y Microbiología.
70. Mahillon J.; R. Rezsöhazy; B. Balet; J. Delcour. 1996. IS231 and other *Bacillus*.
71. Mariño L.; J. Hernández; M. Orozco; J. Narváez. 1996. Caracterización Molecular de Genes cry de *Bacillus thuringiensis* utilizando PCR Extra-Rápida. *Rev. Corpoica*. Vol 1, N° 1.
72. Martínez C.; M. Porcar; A. López; I. Ruiz de Escudero; F. Pérez-Llarena; P. Caballero. 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomología Experimental and Applicata*. Vol III Issue 1. Pages 71-77.
73. Ohba M and K. Aizawa. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *J Invertebr Pathol*. 47: 12-20.
74. Ochoa G y J. Arrivillaga. 2009. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Bol. Mal. Salud Amb*. XLIX(2), Agosto-Diciembre.
75. O'Sullivan D. and T. Klaenhammer. 1993. Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, August. 59(8)2730-2733.
<http://aem.asm.org/content/59/8/2730.full.pdf>
Downloaded from <http://aem.asm.org/> on May 1, 2012 by guest
76. Peruca A P; G. T. Vilas-Boas; OMN. Arantes. 2008. Genetic relationships between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, as revealed by rep-PCR genomic fingerprinting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(5):497-500.
77. Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; Vol. 62. p. 807-813.
78. Poojitkanont Y.; S. Keawsompong; Chanpaisa. 2008. Identification and Characterization of cry Genes Coding for Insecticidal Crystal Protein in *Bacillus thuringiensis* JC 590. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 42: 51 - 60.

79. Porcar M.; V. Juárez-Pérez. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiol Rev. 26: 419-32.
80. Prazanna A.; Xavier R.; Reena C.M.; Lee Y.W.; Marimuthu K, Kathiresan S.; Sreeramanan S. 2011. Mosquitocidal activity of a native *Bacillus thuringiensis* isolate *Bt ReX02* from Gunung Jerai Forest, Malaysia against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 15: 149-155.
81. Radnedge L.; P. Agron; K. Hil; P. Jackson; L. Ticknor; P. Keim; G. Andersen. 2003. Genome Differences That Distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. 69(5):2755-2764.
82. Reyes-Ramirez A.; J. Ibarra. 2005. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* Type Strains and Isolates by using *Bacillus cereus* Group-Specific Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR Analysis. Appl Environ Microbiol. 71(3):1346-55.
83. Rosales T.; R. Salcedo; J. Ibarra; E. Barboza. 2003. Identificación de los genes *cry* en cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con Potencial Insecticida. Acta Universitaria. Vol. 13 N° 2 Mayo-Agosto.
84. Ruiz De Escudero I.; M. Ibañez; A. Carnero; P. Caballero. 2004. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. Bol. San. Veg. Plagas. 30:703-712.
85. Sauka D.; J. Cozzi; G. Benintende. 2005. Screening of *cry2* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina. Antonie van Leeuwenhoek. 88(2):163-165.
86. Sauka D.; G. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Revista Argentina de Microbiología. 40:124-140.
87. Sauka D.; R. Basurto-Ríos; J. Ibarra; G. Benintende. 2010. Characterization of an Argentine Isolate of *Bacillus thuringiensis* Similar to the HD-1 Strain. Neurotrop Entomol. 39(5):767-73.
88. Shelton A.; D. Zhao; T. Roush; T. Metz; E. Earle. 2002. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. Nat. Biotechnol. 18:339-342.

89. Schnepf E.; N. Crickmore; J. Van Rie; D. Lereclus; J. Baum; J. Feitelson; D. Zeigler; D. Dean. 1996. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):775–806.
90. Shagger and Von Jagow. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel electrophoresis for Separation of Proteins in the range from 1 to 100 kDal. *Anal Bioch.* 166, 368-379.
91. Soberón M.; A. Bravo. 2008. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. En: López-Munguía, A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25° aniversario, capítulo 27. Mexico, D.F. UNAM. Pp303-314
92. Tabashnik B E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39:47–79.
93. Tabashnik B E.; N. Finson; R. Groeters F; J. Moar W; W. Johnson M; S. Travers R; P. Martin; C. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1263–1266.
94. Thomas D.; J. Morgan; J. Whipps. 2001. Saunders J. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river, water and dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol.* 67(1);330-338.
95. Valadares G.; B. Whittome; B. Shore; D. Levin. 2001. Identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* strain HD1-Like bacteria from environmental and human samples after aerial spraying of Victoria, British Columbia, Canada, with Foray 48B. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(3):1035-1043.
96. Velasco F. 2010. Estudio de los niveles de expresión temporal del cry 1 en aislados nativos mexicanos de *Bacillus thuringiensis*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica.
97. Ventosilla P.; B. Infante; J. Merello; J. Chauca. 2001. Guía de Prácticas del curso: Producción de *Bacillus thuringiensis israelensis* usando alternativas locales para el control de vectores de enfermedades. Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt" Universidad Peruana

Cayetano Heredia. Rivers of the World (ROW), Organización Panamericana de la Salud (OPS). Setiembre.

98. Ventosilla P.; E. Torres; L. Harman; K. Saavedra; W. Mormontoy; J. Merello B. Infante; J. Chauca. 2005. Conocimientos, actitudes y prácticas en el control de malaria y dengue en las comunidades de Salitral y Querecotillo, departamento de Piura. Mosaico Cient. 2(2):65-69. ISSN 1817-8391.
99. Versalovic J.; T. Koeuth; R. Lupski J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. (24): 6823-6831.
100. Vitelli-Flores J.; R. Gajardob; L. Lagea; Y. Fajardoa; B. Dortab. 2010. Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 30:90-96.
101. Wirtz – Conklin. Técnicas de tinción de bacterias. (<http://www.bionica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>).
102. Xu D.; C. Coté J. 2006. Sequence Diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* Sensus Lato Flagellin (H Antigen) Protein: Comparison with H Serotype Diversity. Appl. Environ. Microbiol. 72(7) 4653-4662.
103. Zhu J.; F. Tan; J. Tang; Li; A. Zheng; P. Li. 2009. Characterization of insecticidal crystal protein *cry* gene of *Bacillus thuringiensis* from soil of Sichuan Basin, China and cloning of novel haplotypes *cry* gene. Annals of Microbiology. 59 (1) 1-8.

ANEXOS

**EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5**

DATOS PARA CÁLCULO CL50 *B.thuringiensis* HD-500

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
0.0011	25	0	0.0000	0.0000	0.0000
0.0055	25	0	0.0000	0.0000	0.0000
0.0110	25	0	0.0000	0.0000	0.0001
0.0550	25	9	0.3600	0.3600	0.3313
0.1110	25	19	0.7600	0.7600	0.8571
0.1390	25	25	1.0000	1.0000	0.9393
0.2770	25	25	1.0000	1.0000	0.9988
0.5500	25	25	1.0000	1.0000	1.0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 3.664

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 12.592

Mu = -1.171128

Sigma = 0.202790

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits	
Intercept	10.775078	1.054130	(8.708983,	12.841172)
Slope	4.931211	0.968061	(3.033811,	6.828612)

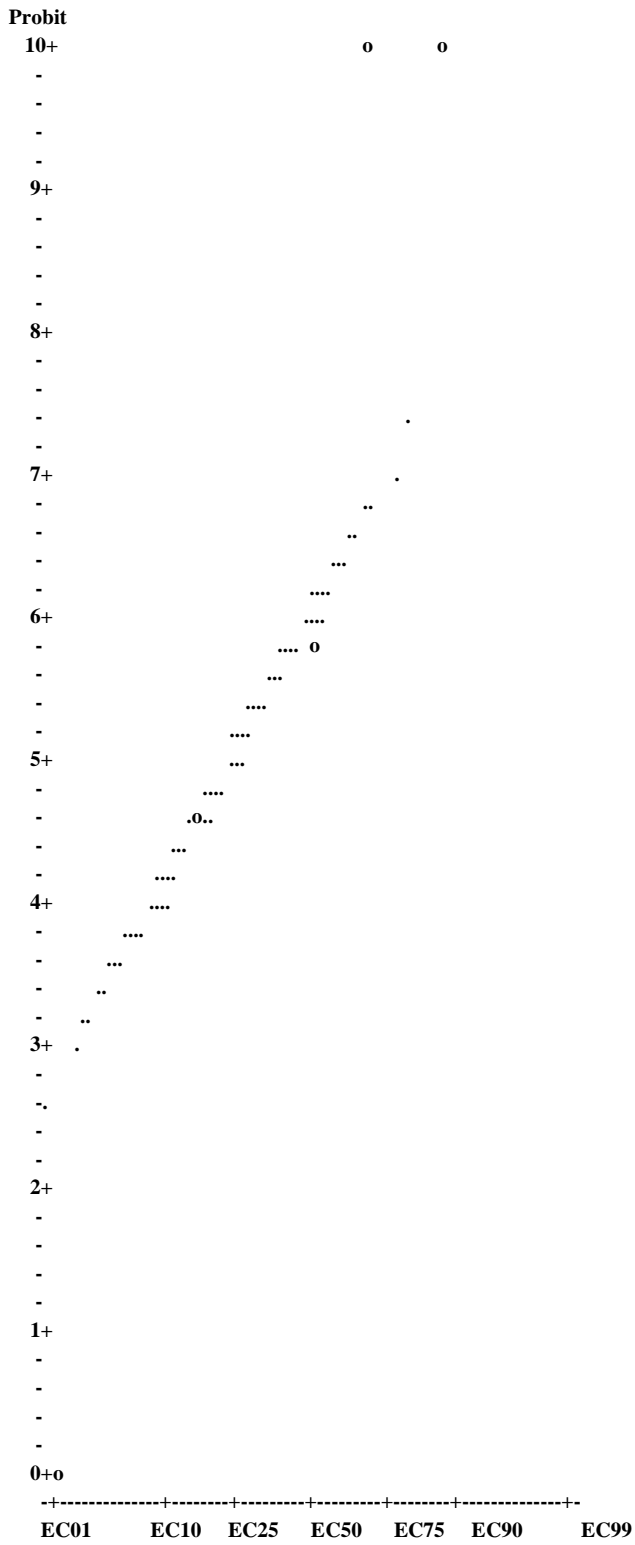
Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

CL50 *B. thuringiensis* HD-500 (CEPA ESTÁNDAR)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

	Exposure	95% Confidence Limits	
Point	Conc.	Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.023	0.010	0.034
LC/EC 5.00	0.031	0.016	0.043
LC/EC 10.00	0.037	0.021	0.048
LC/EC 15.00	0.042	0.026	0.053
LC/EC 50.00	0.067	0.053	0.079
LC/EC 85.00	0.109	0.093	0.141
LC/EC 90.00	0.123	0.103	0.167
LC/EC 95.00	0.145	0.118	0.216
LC/EC 99.00	0.200	0.151	0.3

PLOT OF ADJUSTED PROBITS AND PREDICTED REGRESSION LINE



**EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5**

DATOS PARA CALCULO CL50 CEPA *B. thuringiensis* CAJ1 (92% de mortalidad)

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
0.0011	25	0	0.0000	0.0000	0.0000
0.0055	25	0	0.0000	0.0000	0.0017
0.0110	25	0	0.0000	0.0000	0.0145
0.0550	25	7	0.2800	0.2800	0.3289
0.1110	25	16	0.6400	0.6400	0.6241
0.1390	25	21	0.8400	0.8400	0.7121
0.2770	25	23	0.9200	0.9200	0.9041
0.5500	25	23	0.9200	0.9200	0.9797

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 7.240
 Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level) = 12.592

Mu = -1.081690
 Sigma = 0.401642

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits
Intercept	7.693173	0.377946	(6.952398, 8.433949)
Slope	2.489782	0.367139	(1.770189, 3.209375)

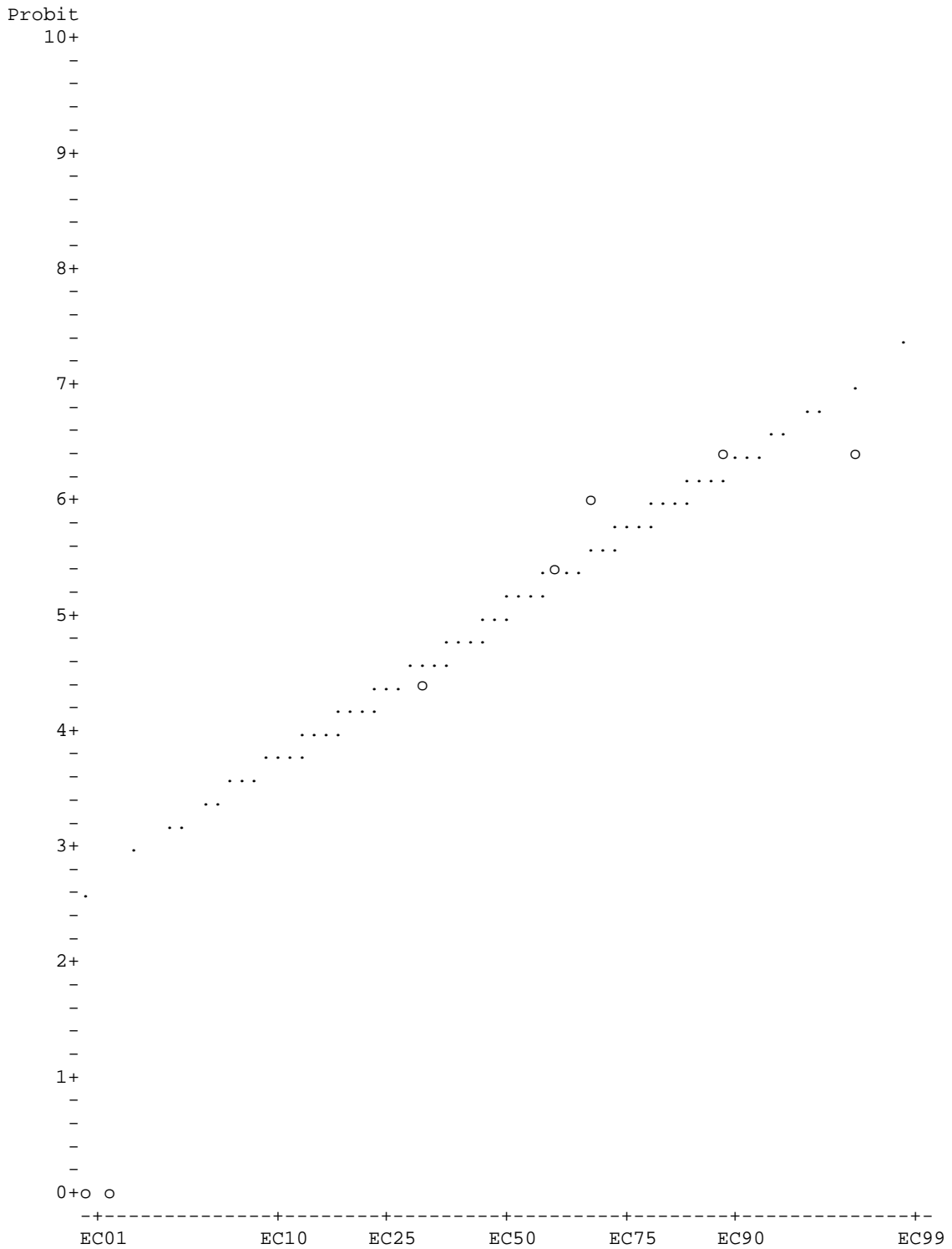
Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

CL50 *B. thuringiensis* CAJ1 (CEPA NATIVA)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.010	0.003	0.017
LC/EC 5.00	0.018	0.008	0.028
LC/EC 10.00	0.025	0.013	0.037
LC/EC 15.00	0.032	0.018	0.045
LC/EC 50.00	0.083	0.062	0.105
LC/EC 85.00	0.216	0.165	0.320
LC/EC 90.00	0.271	0.201	0.431
LC/EC 95.00	0.379	0.267	0.678
LC/EC 99.00	0.712	0.444	1.610

PLOT OF ADJUSTED PROBITS AND PREDICTED REGRESSION LINE



ESTRATEGIA METODOLÓGICA

