



“Aislamiento, caracterización y selección de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de lepidópteros plaga”.



Tesis de Maestría en Biotecnología.

Lic. Amalia González Pombo.

Tutoras: Dra. Silvana Vero y Carmen Rossini, Ph.D.

Cátedra de Microbiología y Laboratorio de Ecología Química.

Departamento de Biociencias. Facultad de Química. UdelAR.

Tribunal: Dra. Ana Acevedo

Dra. Paula Altesor

Dra. Ángela Cabezas

Montevideo, Uruguay. 2018

*“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje,
nunca una llegada”*

Karl R. Popper

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a mis tutoras Carmen y Silvana por la posibilidad de trabajar con ellas, por la paciencia a lo largo de este trabajo que fue largo y por momentos bastante complicado.

A las integrantes del tribunal por todas las sugerencias y aportes a este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, en el LEQ: Anna, Federico, Hernán, Maru, Diana, y María Laura, por la buena onda de todos los días; y Guille por enseñarme todo el manejo de Pseudaletia, desde cómo preparar la dieta para las larvas, cómo sexar las pupas, cómo mantener los adultos, todo...

En el laboratorio 14 de Micro: Silvana A., Gabriela G., Adalgisa, Eloísa, Luciana, Gabriela, Mariana, Cecilia, Angie, Soledad y Belén, por hacer del laboratorio de Micro el mejor ambiente de trabajo.

A mis amigas: Ceci, Flo, Lei, Lourdes y Sofi por acompañarme en este proceso.

A mis padres por haberme dado la posibilidad de estudiar, por haberme dado todo lo que ellos no tuvieron; y a mi hermano por darme para adelante siempre.

A Gabriel (mi amor) por apoyarme desde el principio en todas las etapas de este trabajo, por aguantarme la cabeza, por sostenerme y enseñarme a enfrentar las dificultades.

Y a Dios porque nada de esto habría sido posible sin Él, y porque todo lo que tengo y todo lo que soy se lo debo a Él.

RESUMEN.

El uso de pesticidas para el control de plagas tiene efectos nocivos para la salud humana y el medio ambiente. Como una estrategia alternativa para el control de plagas, se promueve el uso de productos naturales u organismos benéficos, en otras palabras, el control biológico. La bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el biopesticida más utilizado en programas de control biológico y fue el primer organismo utilizado a gran escala en el control de lepidópteros plaga. Bt es una bacteria gram positiva, que produce durante la esporulación cristales parasporales con propiedades insecticidas. Los cristales incluyen proteínas denominadas δ -endotoxinas, dentro de las que se encuentran una gran variedad de proteínas Cry tóxicas para ciertos insectos (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera y Malophaga) pero no para otros, lo que le confiere selectividad de acción. Por ejemplo, las proteínas Cry 1, Cry 2 y Cry 9 codifican proteínas tóxicas para lepidópteros. En este trabajo se aislaron cepas de Bt de suelos de diferentes zonas del país (Salto, Rivera, Treinta y tres, Lavalleja, Rocha y Maldonado), seleccionándose por la presencia de genes cry 1 y cry 2, y por su toxicidad contra larvas de *Pseudaletia adultera* (Lepidoptera: Noctuidae). El bioensayo de toxicidad fue estandarizado en cuanto al número de cristales, y estadio larval. Los resultados de mortalidad de larvas se analizaron mediante tests de χ^2 y mediante curvas de sobrevivencia con el método de Kaplan-Meier. El screening con el diseño optimizado constó de nueve ensayos que incluyeron 22 aislamientos y los controles positivo y negativo correspondientes. En este conjunto de ensayos, los controles negativo y positivo arrojan mortalidades consistentes entre ensayos (17 % y 92 % respectivamente, sin diferencias significativas entre ensayos, $p > 0,05$). En cuanto a los aislamientos testeados, se detectaron cuatro (S2A con 67 % de mortalidad; S3A y M4A con 75 % cada una y Tt 25 con 67 %) que provocaron mayor mortalidad que los controles negativos ($p < 0,05$). Los resultados de los análisis de sobrevivencia arrojaron resultados similares a los de mortalidad. Por otro lado, para aquellos aislamientos que no produjeron alta mortalidad (< 65 %), se evaluaron los efectos sub-letales (χ^2 tests) tomando como indicador el éxito de las larvas de llegar al estado adulto. La capacidad de completar el ciclo de

metamorfosis fue en forma general similar a la del control negativo, con la excepción de dos aislamientos, Tt 23 y M8 los cuales presentaron una menor tasa de emergencia de adultos (20 % y 18 % respectivamente) que el control negativo (> 50 %). Estos resultados motivan a continuar profundizando nuestros estudios para obtener cepas que podrían usarse en la formulación de productos con actividad contra lepidópteros plaga.

ÍNDICE.

1. Introducción.....	1
1.1 Plagas agrícolas y pesticidas.....	2
1.2 Control biológico.....	7
1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.3.1 Productos formulados y plantas transgénicas.....	16
1.4 Patogénesis y resistencia.....	19
1.4.1 Efecto sub-letal.....	21
1.5 Bioensayos.....	22
1.6 <i>Pseudaletia adultera</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	23
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo general.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. Materiales y métodos.....	28
3.1 Aislamiento e identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> a partir de muestras de suelo.....	29
3.1.1 Muestras de suelo y proceso de aislamiento.....	29
3.1.2 Identificación. Prueba de tamizaje: β -hemólisis.....	30
3.1.3 Formación de cristales parasporales.....	30
3.2 Construcción de un cepario de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
3.3 Selección de las cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros.....	32
3.3.1 Extracción de ADN mediante lisis celular.....	32
3.3.2 Amplificación de genes cry.....	32
3.4 Selección de la cepa que presente mayor actividad contra <i>Pseudaletia adultera</i> mediante ensayos <i>in vivo</i>	33
3.4.1 Preparación de los inóculos a aplicar a la dieta de <i>P. adultera</i>	33
3.4.2 Bioensayos contra larvas de <i>Pseudaletia adultera</i>	35
4. Resultados.....	37
4.1 Aislamiento e identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> a partir de muestras de suelo.....	38
4.2 Selección de las cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros.....	40

4.3 Selección de la cepa que presente mayor actividad contra <i>Pseudaletia adaltera</i> mediante ensayos <i>in vivo</i>	42
4.3.1 Mortalidad de larvas al final de los ensayos.	43
4.3.2 Análisis de mortalidad por curvas de Supervivencia de Kaplan Meier....	47
4.3.3 Análisis de efectos sub-letales.....	53
5. Discusión	57
5.1 Aislamiento e identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> a partir de muestras de suelo.....	58
5.2 Selección de cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros – Caracterización mediante perfil de genes cry.	60
5.2.1 Plásmidos que codifican las δ -endotoxinas.	62
5.3 Selección de la cepa que presente mayor actividad contra <i>Pseudaletia adaltera</i> mediante ensayos <i>in vivo</i>	65
5.3.1 Preparación de los inóculos a aplicar a la dieta de <i>P. adaltera</i>	65
5.3.2 Bioensayos contra larvas de <i>Pseudaletia adaltera</i>	65
5.3.3 Análisis de mortalidad.	66
5.3.4 Análisis de efectos sub-letales.....	68
6. Conclusiones y perspectivas	71
6.1 Conclusiones.	72
6.2 Perspectivas.	72
7. Bibliografía	74
8. Anexo	89
8.1 Protocolo de preparación del inóculo a base de cristales y esporas de <i>B. thuringiensis</i> a aplicar a la dieta en los bioensayos contra <i>P. adaltera</i>	90
8.2 Protocolo de realización de bioensayos contra larvas de <i>P. adaltera</i>	91

1. Introducción

1.1 Plagas agrícolas y pesticidas.

La agricultura ha tenido que enfrentar la actividad destructiva de numerosas plagas, enfermedades y malezas desde tiempos inmemoriales, las que reducen la vitalidad y capacidad de producción de las plantas (Mnif and Ghribi 2015).

Una plaga se define “como cualquier especie que el hombre considera perjudicial a su persona, a su propiedad o al medio ambiente”. Las plagas agrícolas disminuyen la producción de los cultivos, reducen el valor de las cosechas o incrementan sus costos de producción, causando un perjuicio económico. En los sistemas agrícolas, las plagas animales están constituidas principalmente por insectos, ácaros, nemátodos, caracoles, aves y roedores; las enfermedades son causadas por microorganismos tales como virus, bacterias, micoplasmas, viroides y hongos; y las malezas son aquellas plantas que resultan indeseables porque compiten con las plantas cultivadas en el uso del espacio, los nutrientes y el agua. Actualmente existe una tendencia a incluir todos los organismos perjudiciales antes mencionados bajo la denominación de plagas agrícolas (*Agrifood Gateway, Horticulture International, NC State University*; Fausto H. Cisneros; 26/05/2018; <https://hortintl.cals.ncsu.edu/es/content/definición-de-plaga-agrícola>). Sucede a su vez, que tanto el ataque de insectos plaga como las enfermedades, son favorecidos por la agricultura intensiva (Karuppuchamy and Venugopal 2016).

Mientras que sólo un pequeño porcentaje de los artrópodos son clasificados como especies plaga; son estas plagas las responsables de una gran devastación de cultivos, destruyendo el 18 % de la producción mundial anual de cultivos y contribuyendo a la pérdida del 20 % de los granos almacenados (Nicholson 2007).

Un plaguicida o pesticida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar plagas y/o patógenos; o a ser utilizadas como regulador de plantas o defoliante (*United States Environmental Protection Agency*; 26/05/2018; <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>). El término pesticida cubre una amplia gama de compuestos incluyendo insecticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, molusquicidas, nematocidas y otros. No se trata de un grupo químico homogéneo,

sino que existen numerosos compuestos químicos con diferentes características (Aktar, Sengupta et al. 2009).

Después de la segunda guerra mundial, la revolución verde proporcionó grandes ventajas a la agricultura, mediante el uso de agroquímicos tales como pesticidas y fertilizantes químicos, cultivares altamente productivos y la mecanización. El resultado fue una importante disminución en una gran variedad de poblaciones de insectos plaga, y como consecuencia los insecticidas sintéticos se volvieron populares debido a la acción residual y a su amplio espectro de toxicidad. El uso de pesticidas sintéticos se volvió el método dominante en el control de plagas en agricultura desde 1940 (Khan, Paul et al. 2016).

Los pesticidas han contribuido a un aumento espectacular en el rendimiento de los cultivos. Incluso han ayudado a limitar la propagación de ciertas plagas y enfermedades. Sin embargo, a pesar de ser indispensables para la agricultura moderna, son una importante fuente de contaminación para organismos vivos y presentan efectos potenciales adversos para el medio ambiente (Yazgan and Tanik 2005). También pueden tener efectos en la salud de los aplicadores y de los consumidores a través de la ingesta de residuos en los alimentos (Damalas 2016). Los efectos adversos para la salud incluyen daños agudos, los cuales se ven en general en los aplicadores, y crónicos. Los efectos agudos en la salud aparecen poco después de la exposición a los pesticidas y pueden manifestarse como irritación en piel y ojos, dolor de cabeza, náuseas, debilidad, dificultad respiratoria, confusión, desorientación, convulsiones, coma e incluso muerte. Los efectos crónicos aparecen meses o años después de la exposición continua a pesticidas aún ante niveles mínimos en el ambiente, o a partir de alimentos o agua contaminados con residuos de los mismos. Estos efectos incluyen desórdenes en los sistemas nervioso, reproductor o inmune, y cáncer entre otros (Mansour 2004; Shishir, Hoq et al. 2014).

Por otro lado, los pesticidas pueden afectar el suelo, dañando las especies de insectos benéficos, los microorganismos del suelo y las lombrices, que naturalmente mantienen el suelo sano (Shishir, Hoq et al. 2014). En los últimos años, se ha registrado un aumento en la incidencia de la contaminación de suelo y agua debido al uso de pesticidas, en gran parte causado por su mal uso (Yazgan

and Tanik 2005). Los pesticidas aplicados en spray pueden impactar directamente sobre vegetación no diana, o pueden desviarse o volatilizarse desde el área tratada y contaminar aire, suelo, agua y plantas no diana (Aktar, Sengupta et al. 2009). En un estudio de identificación y cuantificación de pesticidas en agua de río realizado en España, Pascual y col. (2017) encontraron pesticidas no aprobados por la Unión Europea. Los autores plantean que la detección de dichos productos puede estar relacionada con la persistencia duradera de los mismos, debido a un proceso lento de degradación. La persistencia y la bioacumulación podrían explicar además la evidencia de contaminantes detectados en peces, en este mismo trabajo. En otro estudio sobre el impacto de herbicidas en ecosistemas acuáticos, se observó inhibición en el crecimiento del alga verde planctónica *Pseudokirchneriella subcapitata* (Selenastraceae), y un número de efectos negativos a dosis sub-letales sobre un pequeño crustáceo planctónico filtrador, *Daphnia magna* (Cladocera: Daphniidae) que se alimenta del fitoplancton. Los efectos negativos, fueron detectados a concentraciones permitidas de herbicidas de acuerdo a los puntos de referencia establecidos para la vida acuática, lo cual sugiere que los mismos deben ser actualizados. Las algas están entre las especies no diana más afectadas por la aplicación de herbicidas. A su vez, cualquier declive en la producción primaria, causa un impacto negativo en los consumidores y afecta las funciones del ecosistema, tales como fuente de alimentos y producción de oxígeno. Esto representa una amenaza a la biodiversidad acuática, a la calidad del agua y a la salud del ecosistema (Hasenbein, Peralta et al. 2017).

Muchos de los pesticidas que han sido prohibidos o retirados del mercado en los países desarrollados, aún son producidos y vendidos en los países en desarrollo por empresas nacionales o por multinacionales actuando a través de filiales o empresas conjuntas (Mansour 2004). La imagen completa de la relación costo-beneficio del uso de pesticidas, difiere considerablemente entre países desarrollados y países en desarrollo (Aktar, Sengupta et al. 2009).

Para controlar los efectos adversos de la aplicación indiscriminada de plaguicidas surge el concepto del Manejo Integrado de Plagas (MIP). El uso racional de todo tipo de pesticidas considerado como un pilar importante del MIP, es una estrategia de control de plagas que apunta a una máxima eficacia con un impacto mínimo en

la salud y el medio ambiente, así como también una mínima presencia de residuos en los alimentos (Damalas 2016)

El MIP según la Agencia de Protección Ambiental EPA (*Environmental Protection Agency*) de Estados Unidos, es un enfoque para el control de plagas, que se basa en una combinación de prácticas comunes que utilizan información sobre el ciclo de vida de las plagas y la interacción que éstas tienen con el medio ambiente. Esta información se combina con los métodos de control de plagas disponibles, de los cuales destacamos pesticidas y biopesticidas, y a partir de dicha combinación se intenta controlar el daño provocado por las plagas de la manera más económica, y con el menor peligro posible para las personas, la propiedad y el medio ambiente (Fursan 2012).

Los biopesticidas son una clase de pesticidas derivados de materiales naturales tales como animales, plantas, bacterias y ciertos minerales. Los biopesticidas se dividen en tres clases principales: 1- Los pesticidas bioquímicos son sustancias naturales que controlan las plagas mediante mecanismos no tóxicos. Incluyen sustancias que interfieren con el apareamiento, tales como feromonas sexuales de insectos así como también extractos de plantas que atraen insectos plaga hacia trampas; 2- Pesticidas microbianos consisten en un microorganismo (bacteria, hongo, virus o protozoario) como el ingrediente activo. Los pesticidas microbianos pueden controlar diferentes tipos de plagas, aunque cada ingrediente activo es relativamente específico para su plaga diana. Los pesticidas microbianos más ampliamente utilizados son las cepas de *Bacillus thuringiensis*. Cada cepa de esta bacteria produce una mezcla diferente de proteínas que mata específicamente una o unas pocas especies relacionadas de larvas de insecto; 3- Protectores incorporados a la planta son sustancias con acción pesticida que la planta produce a partir de material genético que le ha sido añadido. Un ejemplo son los genes de las proteínas pesticidas de *B. thuringiensis* que son introducidos al material genético de la planta, y así la planta produce la sustancia que controla la plaga (*United States Environmental Protection Agency*; 28/05/2018; <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides>).

El uso de biopesticidas es un componente importante del MIP y es capaz de mejorar la relación costo-beneficio de la producción de muchos cultivos en todo el mundo (Cespedes, Alarcon et al. 2015). Este hecho, junto con la noción percibida en general, de que los compuestos naturales son más seguros que sus contrapartes sintéticas, explican la preferencia por los pesticidas naturales, o biopesticidas, y la drástica reaparición de interés en estos compuestos (Lima, Melo et al. 2015).

El aumento en la popularidad de los biopesticidas en comparación con los de síntesis química se debe también a los efectos letales poco selectivos de los últimos y al rápido desarrollo de resistencia de los insectos plaga a los insecticidas químicos. Además, si bien existen pesticidas químicos biodegradables, se ha demostrado que otros persisten en el medio ambiente y contribuyen al desarrollo de resistencia en varios organismos (Sanchis 2012; Cespedes, Alarcon et al. 2015). Los biopesticidas, por su parte son biodegradables.

Los bioinsecticidas utilizados actualmente incluyen organismos entomopatógenos y entomófagos, además de compuestos con actividad insecticida derivados de plantas, metabolitos microbianos, y plantas transgénicas. De forma general, los organismos entomopatógenos son aquellos que infectan al insecto y se reproducen en él hasta causarle la muerte (hongos, virus, bacterias, protozoarios, nemátodos) (Tamez Guerra, Galán Wong et al. 2001).

Existe una variedad de factores que pueden afectar la factibilidad económica, la aceptación y el empleo de los bioinsecticidas. Estos factores incluyen el tipo de plaga, el tamaño del mercado, el espectro de plagas que se pueden controlar con un producto y el impacto que el bioinsecticida pueda tener en los insectos benéficos (Tamez Guerra, Galán Wong et al. 2001).

Para lograr una agricultura sustentable, y satisfacer la demanda de productos de origen natural u organismos benéficos para su uso en programas de MIP, se han desarrollado programas biotecnológicos dirigidos a la producción de bioinsecticidas (Amichot, Curty et al. 2015). Un ejemplo es el caso de la cochinilla *Icerya purchasi* (Hemiptera: Margarodidae) que se alimenta de la savia que succiona de hojas, ramas y tronco de algunas plantas, provocando defoliación y muerte de hojas y pequeñas ramas. En 1868 fue descubierta esta plaga en

California debido al impacto devastador que causó en la industria de los cítricos, y ningún tratamiento resultaba efectivo. C. V. Riley y A. Koebele, descubrieron al escarabajo vedalia, *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae) enemigo natural de *I. purchasi* del cual se alimenta. Y en 1890, dos años después de la liberación de los escarabajos en los campos de cítricos, ya se había logrado un control efectivo de la plaga (*Cornell University, College of Agriculture and Life Sciences, Anthony Shelton y Jill Eccleston, 14/08/2018, <https://biocontrol.entomology.cornell.edu/success.php>*).

La biotecnología agrícola está enfocada a dar solución a problemas de baja producción y pérdidas económicas de cultivos, provocadas por factores bióticos y abióticos del campo, y se enfoca principalmente en lograr una agricultura sustentable. Un objetivo de la biotecnología agrícola es reducir la dependencia de pesticidas químicos sin afectar, o incluso incrementando la productividad del campo, lo cual como consecuencia ayuda a reducir los problemas ambientales (Tamez Guerra, Galán Wong et al. 2001). El desarrollo e implementación de biopesticidas constituye una de las posibles aplicaciones para lograr este objetivo, sustentada en el concepto de control biológico, el cual requiere un profundo conocimiento de la biología y la evolución de los patógenos correspondientes (McDonald and Stukenbrock 2016).

1.2 Control biológico.

El control biológico es un componente del MIP. Se define como la reducción de las poblaciones de plagas mediante enemigos naturales y por lo general implica un papel humano activo. En general, las diferentes especies de insectos son controladas por organismos naturales y factores ambientales, sin intervención del hombre, lo cual se conoce como control natural. Los enemigos naturales de insectos plaga, incluyen predadores, parasitoides y patógenos. Los predadores son principalmente especies de vida libre, que consumen una gran cantidad de presas durante su vida. Los parasitoides son especies cuyos estados inmaduros se desarrollan en o dentro de un insecto hospedero, causándole finalmente la muerte. Muchas especies de avispas y algunas moscas son parasitoides. Los patógenos son

organismos causantes de enfermedades, e incluyen bacterias, hongos y virus. Los patógenos matan al hospedero y son relativamente específicos para ciertos grupos de insectos (*Cornell University College of Agriculture and LifeSciences*; PhD Anthony Shelton; 24/05/2018; <https://biocontrol.entomology.cornell.edu/what.php>).

Mientras que muchas especies de bacterias habitan el cuerpo de los insectos estableciendo distintos niveles de relaciones mutualistas, sólo un número limitado de ellas se comporta como patógenos. Estos últimos han desarrollado una multiplicidad de estrategias para invadir al hospedero, para superar su respuesta inmune, para infectarlo y matarlo (Ruiu 2015).

En la relación antagónica entre patógeno y hospedero, se puede observar que existe co-evolución recíproca. Por definición, el patógeno tiene un efecto negativo sobre la eficacia biológica (*fitness*) del hospedero, favoreciéndose en la competencia aquellos hospederos con mecanismos de defensa mejorados. Si la eficacia biológica (*fitness*) del patógeno depende del hospedero, entonces la defensa del hospedero puede ser perjudicial para el patógeno, conduciendo a la selección de patógenos con nuevos mecanismos de ataque. Cuando la interacción persiste en el tiempo, los ciclos de adaptación y contra-adaptación pueden producir las mayores presiones selectivas conocidas en la naturaleza. Por ejemplo, en un estudio de caracterización de los genes del patógeno involucrados en la adaptación co-evolutiva en un sistema de interacción entre patógeno y hospedero animal, utilizaron como modelo el nemátodo *Caenorhabditis elegans* como hospedero animal y *B. thuringiensis* como patógeno natural. Este estudio encontró un aumento en la virulencia del patógeno específicamente favorecida durante la co-evolución con el hospedero, en comparación con la adaptación unilateral del patógeno a un hospedero no cambiante o a un ambiente libre de hospedero (Masri, Branca et al. 2015).

La extensa variedad de cepas de *B. thuringiensis* y de toxinas que éstas producen, permite la producción de bioinsecticidas utilizando la propia bacteria y también permite el uso de los genes que codifican las toxinas para el desarrollo de plantas transgénicas (Monnerat, Batista et al. 2007).

1.3 *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis es una bacteria gram positiva, con flagelo peritrico, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho y que posee la característica de desarrollar endosporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (Figura 1) (Maughan and Van der Auwera 2011). Pertenece al phylum *Firmicutes*, familia *Bacillaceae*, género *Bacillus* y forma parte del grupo de *Bacillus cereus* que incluye otras 11 especies de las cuales *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, y *B. weihenstephanensis* son especies identificadas durante el siglo XX. Sin embargo actualmente hay seis especies más que fueron clasificadas dentro del grupo mediante análisis de genomas. Algunos de los nombres propuestos para estas especies recientemente descubiertas, aún no han sido validados para su publicación (Liu, Lai et al. 2015; Miller, Beno et al. 2016; Bazinet 2017). Ciertas características fenotípicas distinguen a las bacterias del grupo *B. cereus* de otras especies del género. Entre ellas se destaca la presencia de esporas elipsoidales que no deforman el perfil bacilar, la capacidad de producir lecitinasa y la incapacidad de fermentar manitol (Fritze 2004). La diferenciación fenotípica de las especies dentro del grupo no es sencilla.

Además, estudios en la secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr de las especies de este grupo han revelado que comparten una alta similitud de secuencia (99-100 %) lo que sugiere que esta región nucleotídica no sería útil para discriminar entre los miembros de este grupo. *B. thuringiensis*, en particular, se caracteriza por la producción de cristales parasporales de naturaleza proteica con propiedades insecticidas y nematocidas; característica que permite distinguirla de las otras especies del grupo (Bavykin, Lysov et al. 2004; Sauka and Benintende 2008; Xu, Wang et al. 2014).

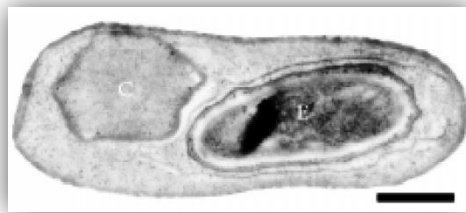


Figura 1: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de *Bacillus thuringiensis*. C: cristal parasporal; E: endospora. Barra: 0,5 μm (Sauka and Benintende 2008).

B. thuringiensis fue descubierta originalmente en 1902 por el biólogo japonés Shigetane Ishiwatari quien la aisló de gusanos de seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) infectados. Sin embargo, fue formalmente caracterizada en 1915 por el bacteriólogo alemán Ernst Berliner quien la aisló de larvas de *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) infectadas, en la provincia alemana de Thuringia, de donde proviene el nombre *thuringiensis* (George and Crickmore 2012).

Dada su capacidad de formar esporas, este microorganismo se encuentra en una amplia variedad de ambientes tales como suelos, agua, plantas, granos almacenados, insectos muertos y heces de insecto. Algunos autores consideran que su principal nicho ecológico son los insectos, basándose en que los aislamientos originales (Ishiwatari, 1901; Berliner, 1915) se obtuvieron a partir de larvas de insectos muertos (Federici 1999; Santana, Moccia-V et al. 2008). Sin embargo, es posible observar una gran variedad de estrategias de este microorganismo para ocupar diferentes nichos y lograr su dispersión en el ambiente, ya sea causando o no, enfermedad. Si bien el suelo es el mayor reservorio de *B. thuringiensis*, desde allí es capaz de colonizar la rizósfera, lo que favorece a su vez la colonización endofítica de las plantas. *B. thuringiensis* puede infectar de forma paraténica¹ invertebrados de suelo como insectos y nemátodos, colonizando el intestino y las heces de los mismos, o de forma patogénica, matando al hospedero y creciendo en su cadáver. Por otra parte, *B. thuringiensis* puede alcanzar la superficie de las plantas mediante salpicaduras de agua de lluvia, o a través de las heces de insectos o pájaros. La lluvia también puede llevar a esta bacteria hacia cuerpos de agua, en donde ésta puede infectar y proliferar en vertebrados o invertebrados y persistir en estos ambientes asociándose a plantas acuáticas u otros sustratos. Es así que *B. thuringiensis* es una bacteria muy versátil que ocupa una gran variedad de nichos (Argôlo-Filho and Loguercio 2014).

¹ Cuando un microorganismo coloniza un determinado hospedero sin causarle daño o enfermedad, y el hospedero no es indispensable para el ciclo de vida del microorganismo, dicho organismo se conoce como “hospedero paraténico”.

Hoy en día, un gran número de cepas de *B. thuringiensis* han sido aisladas y clasificadas en al menos 71 serotipos² H por la reacción de antígeno flagelar (Xu, Wang et al. 2014).

La composición de las inclusiones cristalinas parasporales producidas durante la esporulación es glicoproteica y representan entre el 20 y 30 % del peso seco de la célula. Los cristales presentan distintas morfologías y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (Figura 2) (Sauka and Benintende 2008; Baró Robaina, Fontana Capalbo et al. 2009). Los cristales contienen proteínas insecticidas también llamadas δ -endotoxinas, tales como las proteínas Cry y las proteínas Cyt, en conjunto también llamadas ICPs (*insecticidal crystal proteins*) de una masa molecular que varía entre 25-140 kDa. ICPs individuales o mezclas de ellas, pueden ser extremadamente tóxicas para ciertas especies, sin embargo, prácticamente no tóxicas para otros insectos de la misma familia o incluso del mismo género (Bobrowski, Pasquali et al. 2001; Grove, Kimble et al. 2001; Sauka, Rodriguez et al. 2012; Malo, Nicolás et al. 2018).

Muchas cepas de *B. thuringiensis* producen otro tipo de proteínas insecticidas que son secretadas al medio. Entre ellas se encuentran las proteínas Vip (*vegetative insecticidal proteins*) que no forman cristales y son secretadas durante la fase de crecimiento vegetativo. Esta clase de proteínas incluye los grupos Vip 1, Vip 2 y Vip 3 que se pueden clasificar en 9 subgrupos, 27 clases y 92 subclases según la similitud de secuencia aminoacídica. Recientemente se identificó una nueva familia de proteínas Vip, clasificada como Vip 4; aún se desconocen sus propiedades insecticidas (Estruch, Warren et al. 1996; Sauka, Rodriguez et al. 2012; Palma, Muñoz et al. 2014).

Otro tipo de proteína secretada al medio fue descrita por Donovan y col. (2006) y denominada proteína Sip (*secreted insecticidal protein*) a partir de sobrenadantes de cultivo. Esta proteína designada como Sip 1Aa1 es el primer miembro de esta familia de proteínas de secreción, la cual presenta toxicidad contra larvas de coleópteros (Palma, Muñoz et al. 2014).

² Variedades de un microorganismo identificadas mediante análisis serológico, según los antígenos que presentan en su superficie.

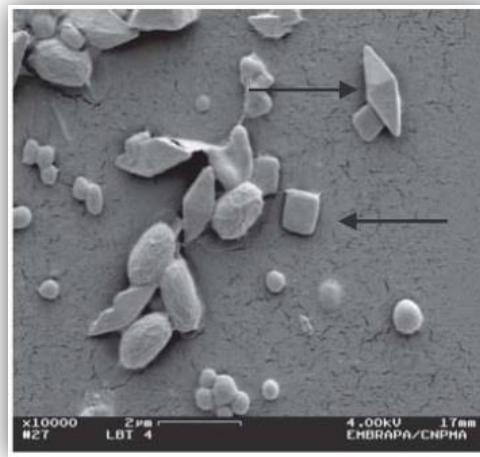


Figura 2: Imagen de microscopía electrónica de barrido de una cepa de *B. thuringiensis*. Las flechas indican los cristales bipyramidales y cúbicos (Baró Robaina et al. 2009).

Asimismo *B. thuringiensis* produce Thuringiensin (Thu), también conocido como β -exotoxina. Se trata de un factor de amplio espectro termoestable, expresado durante la fase de crecimiento vegetativo y excretado al sobrenadante. Thu es un oligosacárido pequeño compuesto por adenosina, glucosa, ácido fosfórico y diácidoglucónico; y tiene un peso molecular de 701 Da. Thu es tóxico para especies de insectos de los órdenes Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Isoptera, y varias especies de nemátodos. Sin embargo, varios experimentos han mostrado que Thu es tóxico también para los mamíferos y su uso ha sido prohibido por la Organización Mundial de la Salud (Liu, Ruan et al. 2014).

Hasta el momento, tomando como base la homología de secuencia aminoacídica, se distinguen más de 300 holotipos³ de δ -endotoxinas, las cuales se han categorizado en 75 familias Cry y 3 familias Cyt (Tanada and Kaya 2012). Las proteínas Cry (*crystal*) son tóxicas de forma específica para determinados órdenes de insectos: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera y Malophaga, así como también para nemátodos, teniendo algunas de ellas un espectro insecticida amplio que abarca más de un orden (Crickmore, Zeigler et al. 1998; Fiuza, Schünemann et

³La primera secuencia aminoacídica reportada de un gen se denomina secuencia holotipo. Las secuencias aminoacídicas reportadas con posterioridad, se definen según el número de cambios de aminoácidos que presenten respecto a la secuencia holotipo.

al. 2012). Las proteínas Cyt son toxinas hemolíticas y citolíticas con actividad contra larvas de dípteros, pero presentan un amplio rango de citotoxicidad *in vitro* contra células de mamíferos. Las toxinas Cyt muestran una limitada homología de secuencia con la familia de proteínas Cry. Se ha determinado la estructura de nueve proteínas Cry y tres proteínas Cyt, las que muestran arquitecturas conservadas según la clase (Cry o Cyt) y sus diferentes mecanismos insecticidas (Sansinenea 2012; Xu, Wang et al. 2014; Xu, Chinte et al. 2015).

Las toxinas Cry y Cyt son proteínas perforadoras de membranas celulares, aunque no relacionadas estructuralmente y difieren en sus requerimientos de componentes esenciales de membrana. Las proteínas Cry se unen a receptores de membrana, mientras que las Cyt se unen con alta afinidad a fosfolípidos insaturados (Ben-Dov 2014).

Respecto a la nomenclatura de las proteínas producidas por *B. thuringiensis*, inicialmente cada nuevo gen caracterizado recibía una designación arbitraria de quienes lo descubrían: icp, cry, Bta, bt1, bt2, etc. El primer intento de sistematizar la nomenclatura genética se basaba en la actividad insecticida de las proteínas para la clasificación primaria de los genes correspondientes. Y los diferentes grupos se nombraban con números romanos: cry I, cry II, cry III, cry IV, etc. Actualmente, para organizar la inmensa cantidad de datos obtenidos mediante los esfuerzos de secuenciación genómica, surgió un nuevo paradigma en la nomenclatura, basado en el sistema internacionalmente reconocido de nomenclatura de la superfamilia del citocromo P-450. La base de este sistema es asignar nombres a miembros de superfamilias de genes de acuerdo con el grado de divergencia evolutiva, estimada mediante algoritmos de árboles filogenéticos. El formato de nomenclatura está diseñado para transmitir información sobre dichas relaciones filogenéticas, añadiendo a la raíz mnemotécnica números y letras asignados de forma jerárquica, para indicar grados de divergencia. Este nuevo sistema cambia los números romanos por números arábigos en el rango primario, luego se va agregando una letra mayúscula y una letra minúscula, según dónde se ubique el gen en el árbol filogenético, por ejemplo cry 23Aa. Existe un comité del Centro de Stock Genético de Bacillus, BGSC (*Bacillus Genetic Stock Center*) para asistir a quienes trabajan en el campo de la genética de *B. thuringiensis* en la asignación de nombres a nuevos

genes cry y cyt. La lista actualizada de genes correspondientes a toxinas de *B. thuringiensis* está disponible en internet en la siguiente URL: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html (Crickmore, Zeigler et al. 1998).

Las clases Cry 1, Cry 2 y Cry 9 son proteínas tóxicas para lepidópteros (Shu, Su et al. 2013). Las proteínas Cry 3, Cry 7, Cry 8, Cry 18, Cry 34, Cry 35 y Cry 43 son efectivas contra coleópteros. Varios grupos de proteínas Cry tales como Cry 2, Cry 4, Cry 10, Cry 11, Cry 16, Cry 17 entre otros, tienen actividad insecticida contra dípteros. Mientras que las proteínas Cry 5, Cry 6, Cry 12, Cry 13, Cry 14, Cry 21 y Cry 55 presentan actividad contra nemátodos (Guan, Dai et al. 2014).

Los genes cry y cyt que codifican las δ -endotoxinas se localizan en plásmidos de alto peso molecular. Actualmente más de 560 genes cry han sido identificados y clasificados en 68 clases según la homología de las proteínas que codifican (Crickmore 2016). Las cepas de *B. thuringiensis* suelen presentar un conjunto de plásmidos, cuyo número puede variar entre 1 y 17 con tamaños que van de 2-250 kb (González and Carlton 1984; Reyes-Ramírez and Ibarra 2008; Baig and Mehnaz 2010).

Los patrones plasmídicos se han utilizado para caracterizar cepas, Reyes-Ramírez e Ibarra (2008) compararon el perfil plasmídico de diferentes cepas de *B. thuringiensis*, las cuales mostraron patrones plasmídicos únicos. Esto evidencia la importancia de esta herramienta como procedimiento de caracterización y revela el carácter único y complejo de esta característica de *B. thuringiensis* (Hercos Velicente and Gomes De Paula Lana 2008).

En un patrón plasmídico se reconocen dos grupos de plásmidos, aquellos que son ≤ 30 MDa y los que son > 30 MDa llamados megaplásmidos. No se ha encontrado una función específica de los plásmidos pequeños, razón por la cual se denominan "crípticos", mientras que la principal función reconocida de los megaplásmidos es contener los genes de las δ -endotoxinas (Reyes-Ramírez and Ibarra 2008).

La bacteria *B. thuringiensis subsp. israelensis* contiene un megaplásmido llamado pBtoxis (128 kb) que codifica varias proteínas Cry y Cyt. Además el plásmido contiene varias secuencias que codifican para otras proteínas cuyo rol es promover

la formación del cristal y aumentar la viabilidad celular, actuando probablemente como chaperonas (Berry, O'Neil et al. 2002; Ben-Dov 2014).

Más del 23 % de los genes del plásmido pBtoxis se asemejan a genes relacionados con transposones, lo cual favorece eventos de recombinación entre cepas de *B. thuringiensis*. Entre los elementos móviles encontrados hay dos transposones pertenecientes a la familia Tn3 y varias secuencias de inserción pertenecientes a las tres grandes familias IS de procariotas (Zghal and Jaoua 2006). La estructura dinámica del plásmido podría eliminar o inactivar genes cry y por lo tanto, causar una pérdida parcial o total de la actividad insecticida (Elleuch, Zribi Zghal et al. 2015).

Mientras que la mayoría de las toxinas cristalinas de *B. thuringiensis* son codificadas por plásmidos grandes, cuya expresión está bajo el control de promotores dependientes de la esporulación, también hay toxinas Cry crípticas que no son expresadas. Como es el caso de un aislamiento argentino de una cepa de *B. thuringiensis* (INTA TA24-6) la cual posee un gen cry 2Ab críptico que aparentemente se transcribe pero no se traduce a proteína. El alto nivel de expresión de proteínas cristalinas es controlado por una variedad de mecanismos que ocurren a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traduccionales (Sauka, Basurto-Ríos et al. 2010; Deist, Rausch et al. 2014).

Más allá de las estrategias de expresión de las proteínas Cry, la estabilidad de los altos niveles de producción de toxinas se alcanza mediante la cristalización, de manera que las proteínas quedan protegidas de la degradación por endoproteasas. Las proteínas Cry grandes (120-140 kDa) cristalizan espontáneamente debido a la presencia de un motivo conservado C-terminal rico en cisteínas, llamado "dominio estructural". Para superar la ausencia de este dominio estructural en las demás proteínas Cry, *B. thuringiensis* ha desarrollado diferentes estrategias post-traduccionales como la cristalización dirigida por proteínas de ayuda que están cercanas a los genes cry o cyt, o por chaperonas (Porcar, Délecluse et al. 2014).

Presumiblemente, la capacidad para la cristalización *in vivo* evolucionó en *B. thuringiensis* como un mecanismo para almacenar las toxinas de una forma concentrada y con un manejo eficiente del espacio (Sawaya, Cascio et al. 2014).

Actualmente varias decenas de miles de aislamientos de *B. thuringiensis*, obtenidos de diferentes ambientes (tales como insectos muertos, agua, suelo y ambientes marinos), están distribuidos entre varias colecciones públicas y privadas, y son considerados potenciales “reservorios” de nuevas toxinas insecticidas y/o nematocidas. Sin embargo, para poder estimar el riesgo de liberar cualquier microorganismo al ambiente es importante comprender la manera en que éste interactúa con sus alrededores y con la demás biota (Quesada-Moraga, García-Tóvar et al. 2004; Öztürk, Açıık et al. 2009).

Por ejemplo, los renacuajos y las larvas de mosquitos coexisten naturalmente en aguas estancadas y compiten por recursos, de manera que los renacuajos podrían estar expuestos a los insecticidas contra mosquitos. Los efectos de *B. thuringiensis israelensis* (usado en todo el mundo en el control de dípteros y recomendado para el control del vector del dengue) en anfibios no han sido lo suficientemente estudiados. De hecho, las pruebas utilizadas para justificar la aprobación para el uso y la liberación al mercado de los productos de *B. thuringiensis*, y los protocolos utilizados para evaluar el desarrollo de toxicidad, en algunos casos han sido superficiales (Dos Santos, Teixeira et al. 2013; Lajmanovich, Junges et al. 2015).

1.3.1 Productos formulados y plantas transgénicas.

Muchos pesticidas modernos son biodegradables, pero otros se degradan lentamente y tienen la capacidad de bioacumularse en la cadena trófica y en los principales depredadores a través del consumo de biota contaminada (Cespedes, Alarcon et al. 2015). En cambio, las formulaciones de *B. thuringiensis*, siendo proteínas son fácilmente degradadas y persisten muy poco en el suelo, produciendo un efecto despreciable en la salud del mismo (Singh, Boora et al. 2007).

De hecho, *B. thuringiensis* es el insecticida biológico más aplicado en el mundo y se utiliza para controlar diversos insectos y nemátodos que afectan la agricultura, la

actividad forestal y que transmiten patógenos humanos y animales (Sauka and Benintende 2008).

Los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* fueron comercializados por primera vez en Francia en 1938 con poco éxito. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas estrategias de cultivo de células microbianas y la posibilidad de realizar dichos cultivos en escala industrial, estos productos mostraron un gran crecimiento en el mercado a partir de los años 1950s. Inicialmente *B. thuringiensis* var *kurstaki* (la primera cepa aislada para control biológico) dominó el mercado y fue utilizada para el control biológico de lepidópteros plaga en una gran variedad de cultivos. Después del descubrimiento de *B. thuringiensis* var *israelensis* en 1976, el comercio de *B. thuringiensis* se amplió aún más, debido a la actividad larvicida de esta bacteria contra *Aedes aegyptii* (Diptera: Culicidae), principal vector de enfermedades humanas como el dengue. Actualmente entre los microorganismos, *Bacillus thuringiensis* es el bioinsecticida más utilizado en programas de control biológico (50 % del mercado de bioinsecticidas) (Elsayed, Othman et al. 2014; Amichot, Curty et al. 2015).

En 1970 Laboratorios Abbot ingresó al mercado con Dipel, la primera preparación comercial a base del aislamiento *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) que fue utilizada para el control de varios lepidópteros plaga de cultivos, tales como *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), y en plagas forestales tales como *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) y *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) (Sansinenea 2012).

Con el paso del tiempo, *B. thuringiensis* y sus productos han sido formulados en varias formas para su aplicación como agentes de control biológico. Tales formulaciones pueden ser sólidas (polvos o granulados) o líquidas. Actualmente hay más de 400 formulaciones a base de *B. thuringiensis* registradas en el mercado y la mayoría contienen proteínas insecticidas y esporas. Los productos formulados de *B. thuringiensis* se aplican directamente en forma de pulverizaciones (George and Crickmore 2012).

La comercialización de plantas que expresan proteínas Cry para el manejo de insectos plaga, ha revolucionado la agricultura y se ha convertido en una herramienta importante en los programas de manejo integrado de plagas. Los cultivos transgénicos que expresan toxinas Cry han demostrado ser eficaces en el control de importantes plagas de insectos agrícolas. Algunos genes cry como: cry 1Ab, cry 1Ac, cry 1F y cry 2Ab han sido introducidos en maíz y algodón, resultando en un menor uso de insecticidas químicos y en algunos casos, en un mayor rendimiento del cultivo (Liu, Chen et al. 2014).

El uso de genes cry en plantas transgénicas se volvió una estrategia en el control de plagas a mediados de los años 90. La primera generación de cultivos de *B. thuringiensis* (Bt) se generó mediante la transferencia de un único gen cry al genoma de la planta. La segunda generación de cultivos Bt incorpora la combinación de dos o más genes de *B. thuringiensis* en la planta, ofreciendo un espectro de acción más amplio y reduciendo la posibilidad de que los insectos plaga desarrollen resistencia. Actualmente, el algodón Bt de segunda generación aprobado, contiene varias combinaciones de genes de *B. thuringiensis*, tales como Bollgard II (que expresa Cry 1Ac y Cry 2Ab), WideStrike (que expresa Cry 1Ac y Cry 1F) y VipCot (que expresa Cry 1Ab y Vip 3A). La elección de qué genes utilizar en estas combinaciones, se basa en la habilidad de las dos toxinas de unirse a diferentes receptores dentro del intestino del insecto, ya que la alteración del sitio de unión es un mecanismo de resistencia ampliamente extendido. Otro aspecto importante a tener en cuenta es la interacción del efecto de ambas proteínas, la cual puede ser sinérgica o antagónica (Lemes, Davolos et al. 2014).

Los cultivos transgénicos que expresan varias toxinas Cry actualmente cubren más de 160 millones de hectáreas en todo el mundo, lo que resulta en una protección efectiva contra el daño de los insectos y en una reducción de la dependencia de los insecticidas químicos (Portugal, Gringorten et al. 2014).

Además la expresión de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* en las plantas ha sido especialmente útil contra plagas que atacan partes de la planta que generalmente no están bien protegidas por la aplicación de insecticidas convencionales. Algunos lepidópteros perforan el tallo de las plantas y destruyen su integridad estructural,

y de esa forma dentro del tallo la plaga se encontraría relativamente a salvo de un insecticida aplicado en la superficie de la planta (Khan, Paul et al. 2016).

1.4 Patogénesis y resistencia.

Las proteínas Cry se forman como protoxinas de 130 kDa y son activadas proteolíticamente por enzimas del intestino del insecto, lo que da como resultado un fragmento de 60 kDa, resistente a las proteasas del intestino del insecto y capaz de destruir las células del intestino (Portugal, Gringorten et al. 2014).

Sin embargo, el primer impacto de la toxina Cry en el insecto es el cese de la alimentación debido a la parálisis del intestino. Las células del intestino se hinchan conduciendo a un desbalance iónico y a la muerte. Los eventos moleculares que conducen a la muerte del insecto mediada por toxinas Cry son controvertidos, pero los pasos iniciales aceptados se describen a continuación. El proceso insecticida de las δ -endotoxinas comienza con la disolución del cristal bajo las condiciones alcalinas del lumen del intestino del insecto. Dicha solubilización genera una protoxina inactiva que debe ser activada por las proteasas del intestino. Es así, que la protoxina es clivada proteolíticamente en el extremo C-terminal y/o en el N-terminal, generando la toxina activada. La toxina entonces atraviesa la matriz peritrófica y se une a los receptores de la membrana apical de las células del intestino, donde oligomeriza y forma canales iónicos o poros, que conducen a la lisis osmótica de las células, daño en el tejido epitelial del intestino y muerte de la larva. Tanto la activación de la protoxina como la unión de la toxina activada a los receptores específicos que los insectos susceptibles expresan en las células del intestino, son pasos clave que explican la actividad insecticida de las proteínas (Deist, Rausch et al. 2014; Elleuch, Zribi Zghal et al. 2015; Obata, Tanaka et al. 2015).

Los receptores de toxina mejor caracterizados son las proteínas tipo cadherina y las N-aminopeptidasas (APN), aunque otros tipos de receptores como la fosfatasa alcalina (ALP), proteínas transportadoras ABC (ATP - *binding cassette*) y los glicolípidos han sido reportados en varios órdenes de insectos y nemátodos. La superfamilia de cadherinas constituye un receptor importante de varias clases de

toxinas Cry en especies de insectos de al menos tres órdenes (Contreras, Benito-Jardón et al. 2015; Qiu, Hou et al. 2015).

El desarrollo de resistencia a las toxinas Cry es un proceso gobernado por un gran número de factores, mutaciones que alteren cualquiera de los pasos en el modo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis*, potencialmente pueden conducir a resistencia. Hasta el momento, han sido reportados varios mecanismos de resistencia, incluyendo alteraciones en las proteasas digestivas del intestino, alteraciones en los niveles de fosfatasa alcalina, respuesta inmune elevada, aumento de la producción de esterasa y reducción en la unión de la toxina Cry. Sin embargo, el trastorno en la unión de la toxina con los receptores del intestino es el mecanismo de resistencia más común en lepidópteros (Lemes, Davolos et al. 2014; Zhu, Lei et al. 2015).

El amplio uso de cultivos Bt ha aumentado la presión de selección de insectos resistentes. Desde que los cultivos Bt se comercializaron por primera vez en 1996, al menos ocho especies diferentes de insectos han desarrollado resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* en condiciones de campo. El desarrollo de insectos resistentes en plantas transgénicas amenaza el uso sustentable de la tecnología de *B. thuringiensis* en la protección de cultivos, ya sea mediante cultivos transgénicos o mediante las formulaciones aplicadas en spray. Una estrategia es el uso de refugios de plantas no-Bt que aumentan la supervivencia de plagas susceptibles y constituyen una reserva de un pool de alelos susceptibles a *B. thuringiensis* en la población (Zhang, Ma et al. 2013; Liu, Chen et al. 2014; Gómez, Flores et al. 2015).

Otra estrategia es la optimización de la toxina (mediante modificación de los sitios de corte de las proteasas, intercambio de dominios, mutagénesis sitio-dirigida y adición de péptidos) la cual proporciona un enfoque muy útil para extender la utilidad de estas proteínas en la supresión de plagas que exhiben una baja susceptibilidad a las toxinas nativas y para superar la resistencia en el campo (Deist, Rausch et al. 2014).

Los beneficios de larga duración de los insecticidas a base de *B. thuringiensis* y de los cultivos Bt dependerán mayormente de la comprensión del modo de acción de

las proteínas Cry y de las bases bioquímicas y genéticas de la resistencia en los insectos (Park, González-Martínez et al. 2014; Guo, Kang et al. 2015).

El manejo efectivo del desarrollo de resistencia a *B. thuringiensis* en las poblaciones de insectos, requiere una comprensión cabal de los mecanismos de resistencia. Y por su parte, comprender los mecanismos de resistencia también puede proporcionar nuevos conocimientos en el modo de acción de las toxinas Cry (Zhu, Lei et al. 2015).

A pesar de la importancia de la amplia variedad de toxinas que dan lugar a la acción entomopatógena de *B. thuringiensis*, sólo se ha publicado información estructural de un pequeño grupo de dichas toxinas. Un conocimiento más profundo de la estructura es crucial para la comprensión de la interacción toxina-receptor (Palma and Berry 2016).

1.4.1 Efecto sub-letal.

En la aplicación de *B. thuringiensis* en el campo, la exposición de los insectos a las toxinas es generalmente un evento transitorio. Esto se debe a que las aplicaciones de la toxina normalmente no cubren la totalidad de la planta, y/o a que el movimiento de las larvas reduce el tiempo de exposición a las toxinas. Bajo estas condiciones, la posibilidad de que la larva esté expuesta a concentraciones sub-letales de la toxina prevalece, ya sea que dicha exposición sea continua o intermitente en la naturaleza (Salama, Foda et al. 1981).

Estudios realizados en el lepidóptero *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) indican que la proteína Cry 1Ac (65 kDa) administrada a una concentración sub-letal, puede ser tomada y transferida a la descendencia en la cual puede aumentar la mortalidad y el tiempo de desarrollo (Paula, Andow et al. 2014).

Se han evaluado los efectos biológicos de dosis sub-letales y el tiempo de exposición a bajas concentraciones de toxina durante y después de remover la toxina de la dieta en ensayos realizados contra tres especies de lepidópteros: *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Se observó retardo en el desarrollo larval, reducción en la producción de huevos y en la fertilidad,

reducción importante en el peso de las pupas y aparición de deformidades tanto en las poblaciones de pupas como de adultos. La influencia de la exposición a concentraciones sub-letales de la toxina también se manifestó en términos de disminución en la emergencia de adultos, reducción de la fecundidad y período generacional prolongado (Salama, Foda et al. 1981).

Se podría concluir que la exposición a niveles sub-letales de las toxinas de *B. thuringiensis* o la reducción en el tiempo de exposición a las mismas, inducen varios efectos biológicos en las especies evaluadas que reducen indirectamente la potencia de los daños que las plagas causan a la planta (Salama, Foda et al. 1981).

1.5 Bioensayos.

La determinación de toxicidad mediante bioensayos es un paso complementario crítico en la identificación de un aislamiento (Ammouneh, Harba et al. 2011).

Los bioensayos se utilizan para medir los parámetros clave para seleccionar cepas eficaces en el control microbiológico, incluyendo factores tales como el rango de hospedero, velocidad de muerte y actividad contra distintos estadios del insecto. Se ha descrito una gran variedad de métodos de bioensayos y los investigadores deben seleccionar la técnica más apropiada basados en el conocimiento de factores tales como la bacteria patógena y su modo de acción, la especie plaga a evaluar y su forma de alimentación, y si es plausible el mantenimiento de una colonia de laboratorio (O'Callaghan, Glare et al. 2012).

La realización de controles es crucial en cualquier bioensayo. El control negativo debería incluir cualquier agente de dilución o ingrediente utilizado en la preparación de los tratamientos, excepto el agente activo (O'Callaghan, Glare et al. 2012).

Los bioensayos en los que se utiliza dieta artificial son altamente reproducibles y eficientes. Los ensayos a base de dieta, no tienen la necesidad de coleccionar o mantener una provisión de material foliar, el cual es inherentemente más variable que la dieta artificial. Obviamente este método sólo puede utilizarse cuando la especie en estudio puede ser alimentada con dieta artificial, cuando ésta permite el

crecimiento normal del insecto y no es perjudicial para el agente activo que se quiere evaluar (O'Callaghan, Glare et al. 2012).

Grupos de investigación de varios países han realizado un gran número de trabajos en los que han evaluado la actividad insecticida de diferentes toxinas de *B. thuringiensis* contra distintas especies de lepidópteros plaga. Las larvas en algunos casos son alimentadas con dieta artificial, en otros con discos de hojas o también con dieta artificial mezclada con hojas trituradas. Generalmente la dieta es tratada con una suspensión de esporas y cristales de los aislamientos cuya toxicidad se desea evaluar. Se han realizado bioensayos con larvas de 1°, 2° y 3° estadio. Para el control negativo se utiliza agua destilada o buffer de solubilización, en lugar de las proteínas de *B. thuringiensis*. En la mayoría de los casos se registra la mortalidad de las larvas hasta el estado de pupa. Y las larvas se consideran muertas si no responden ante el contacto con algún elemento, como por ejemplo un pincel fino. En los ensayos en los que se evaluó además el posible efecto sub-letal de las toxinas, se registraron otros parámetros tales como el tiempo de desarrollo de los individuos desde el estado de larva hasta la fase de pupa, el porcentaje de larvas que alcanzaron el estado de pupa, el peso individual de cada pupa, y el número de adultos que emergieron. Incluso hay bioensayos realizados con adultos de lepidópteros en los que se analizó la transferencia de las toxinas de *B. thuringiensis* a la siguiente generación (Dubois and Dean 1995; Quesada-Moraga, García-Tóvar et al. 2004; Blibech, Ksantini et al. 2012; Pérez-Guerrero, Aldebis et al. 2012; Lemes, Davolos et al. 2014; Li and Bouwer 2014; Paula, Andow et al. 2014; Gulzar and Wright 2015).

1.6 *Pseudaletia adultera* (Lepidoptera: Noctuidae).

Los insectos fitófagos son la mayor amenaza a la producción de alimentos para consumo humano, y las larvas de lepidópteros se consideran los insectos más destructivos. Larvas de lepidópteros que se encuentran en todo el mundo, atacan diferentes plantas cultivadas y silvestres, causando graves pérdidas económicas (Nicholson 2007; Elleuch, Zghal et al. 2014).

Pseudaletia adultera (Figura 3) representa la principal plaga del trigo en Uruguay. Su nombre común es lagarta de los cereales, lagarta del trigo u oruga militar. Su distribución se extiende al norte de Argentina, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay. La importancia de este insecto está dada por dos razones fundamentales: sus ataques son frecuentes y los hospederos que ataca (alfalfa, alpiste, arroz, avena, cebada, centeno, maíz, raigrás, lino y tomate) ocupan un área importante de la región agrícola-ganadera del país. Esta situación determina que casi todos los años se utilicen importantes cantidades de insecticidas en un área considerable del país. El tipo de daño que causa varía de acuerdo con el hospedero. En trigo, las larvas se alimentan fundamentalmente de hojas, en cebada cortan las espigas, y en avena y raigrás cortan el grano, por lo tanto, las pérdidas son directas (Bentancourt and Scatoni 1999). Se trata de un lepidóptero plaga cuya distribución está restringida a nuestra región y no hay demasiados estudios sobre ella. Localmente, en el marco de estudios de comportamiento de este noctúideo se había logrado establecer y mantener una colonia de laboratorio en el Laboratorio de Ecología Química (Rehermann, Altesor et al. 2016). Por estas razones en este trabajo, se utilizó *P. adultera* como insecto plaga para la realización de los ensayos *in vivo*.

En este contexto, el presente trabajo pretendió ampliar el repertorio de *B. thuringiensis* aislados localmente, con especial énfasis en aquellos que fueran activos contra *P. adultera*. La búsqueda de nuevas cepas de *B. thuringiensis* se basa en el interés de desarrollar un producto formulado a partir de cepas adaptadas al ambiente en el cual sería aplicado, con la intención de disminuir la actual dependencia de productos importados. Esta idea constituye un paso en el desarrollo de la industria local, así como también de la ciencia básica en tanto abre el camino al descubrimiento de nuevas toxinas cry.

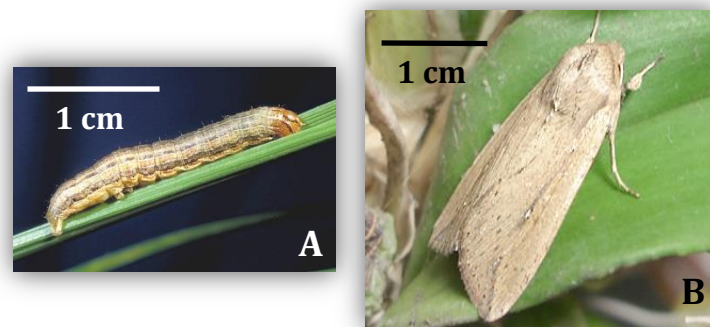


Figura 3: Larva (A) y adulto (B) de *Pseudaletia adultera*. Este lepidóptero representa la principal plaga del trigo en Uruguay (Bentancourt and Scatoni 1999).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general.

- Construir un cepario nacional de *Bacillus thuringiensis* a partir del cual seleccionar una cepa efectiva en el control de *Pseudaletia adultera*.

2.2 Objetivos específicos.

- Poner a punto los métodos de aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *B. thuringiensis*.
- Aislar cepas nativas de *B. thuringiensis* a partir de muestras de suelo de diversas zonas del país.
- Construir un cepario con las cepas nativas identificadas.
- Seleccionar las cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros.
- Seleccionar la cepa que presente mayor actividad contra *Pseudaletia adultera*, mediante ensayos *in vivo*.

3. Materiales y métodos

3.1 Aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo.

3.1.1 Muestras de suelo y proceso de aislamiento.

Se trabajó con 110 muestras de suelo recolectadas en diferentes zonas del país, en los departamentos de Salto, Rivera, Treinta y Tres, Lavalleja, Rocha y Maldonado (Figura 4). Las muestras de suelo, una vez recolectadas en bolsas plásticas fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso. Los aislamientos obtenidos fueron nombrados haciendo referencia a la procedencia de la muestra de suelo de la cual surgieron; así las cepas M son las provenientes de Minas, las cepas S son las provenientes de Salto, las cepas R de Rocha, las cepas M' de Maldonado, las cepas Tt de Treinta y Tres, y las cepas Riv provienen de Rivera.



Figura 4: Mapa del Uruguay donde se señalan los departamentos de los cuales se tomaron las muestras de suelo para este trabajo.

Se utilizó el **método de aislamiento** desarrollado por Baig y Mehnaz (2010) con modificaciones. Se incubó 1 g de suelo en 9 mL de NaAcO 0,3 M durante 4 h a 37 °C con agitación a 150 rpm. Luego se pasó 1 mL de la suspensión resultante a un tubo

de 1,5 mL y se calentó a 80 °C durante 10 min. Finalmente se realizó aislamiento por estría en placa de MYP (Manitol, Yema de huevo, Polimixina), medio selectivo y diferencial para bacterias del grupo *Bacillus cereus* sensu lato (Chang, Shangkuan et al. 2003), y se incubó a 28 °C durante 24-48 h.

Al finalizar la incubación se seleccionaron las colonias típicas de bacterias del grupo *Bacillus cereus*, es decir aquellas que no fermentaban el manitol, estaban rodeadas por un precipitado causado por la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo por acción de lecitinasa producida por el microorganismo, y correspondían a bastones gram positivos esporulados, cuya espora no deformaba el perfil bacilar (Logan and De Vos 2009). A partir de dichas colonias se realizó un reisolamiento por estría en placa de medio no selectivo T3 (3 g de triptona, 2 g de triptosa, 1,5 g de extracto de levadura, 0,05 M de fosfato de sodio y 0,005 g de MnCl₂ por litro de agua (Travers, Martin et al. 1987)) y se incubó a 28 °C por 24 h. En algunos casos se tomaron hasta dos colonias típicas del grupo *Bacillus cereus*, con diferente morfología, para sembrar en placa de medio T3.

A continuación se describe la técnica de identificación utilizada y esquematizada en la figura 5.

3.1.2 Identificación. Prueba de tamizaje: β-hemólisis.

Todos los aislamientos fueron sembrados en placa de Agar-sangre para evaluar la actividad β-hemolítica de los mismos. El resultado negativo de esta prueba es característico de la especie *Bacillus anthracis* (Logan and De Vos 2009).

3.1.3 Formación de cristales parasporales.

Se realizaron preparados a partir de cultivos en placa de T3 de 2-3 días de incubación a 28 °C. En cada caso se realizó un frotis, se tiñó con Azul de Coomassie (Ammons, Rampersad et al. 2002) y se observó al microscopio óptico (Olympus CX 21) por inmersión en busca de cristales parasporales, ya que la presencia de los mismos, es característica distintiva de la especie *Bacillus thuringiensis* (Logan and De Vos 2009).

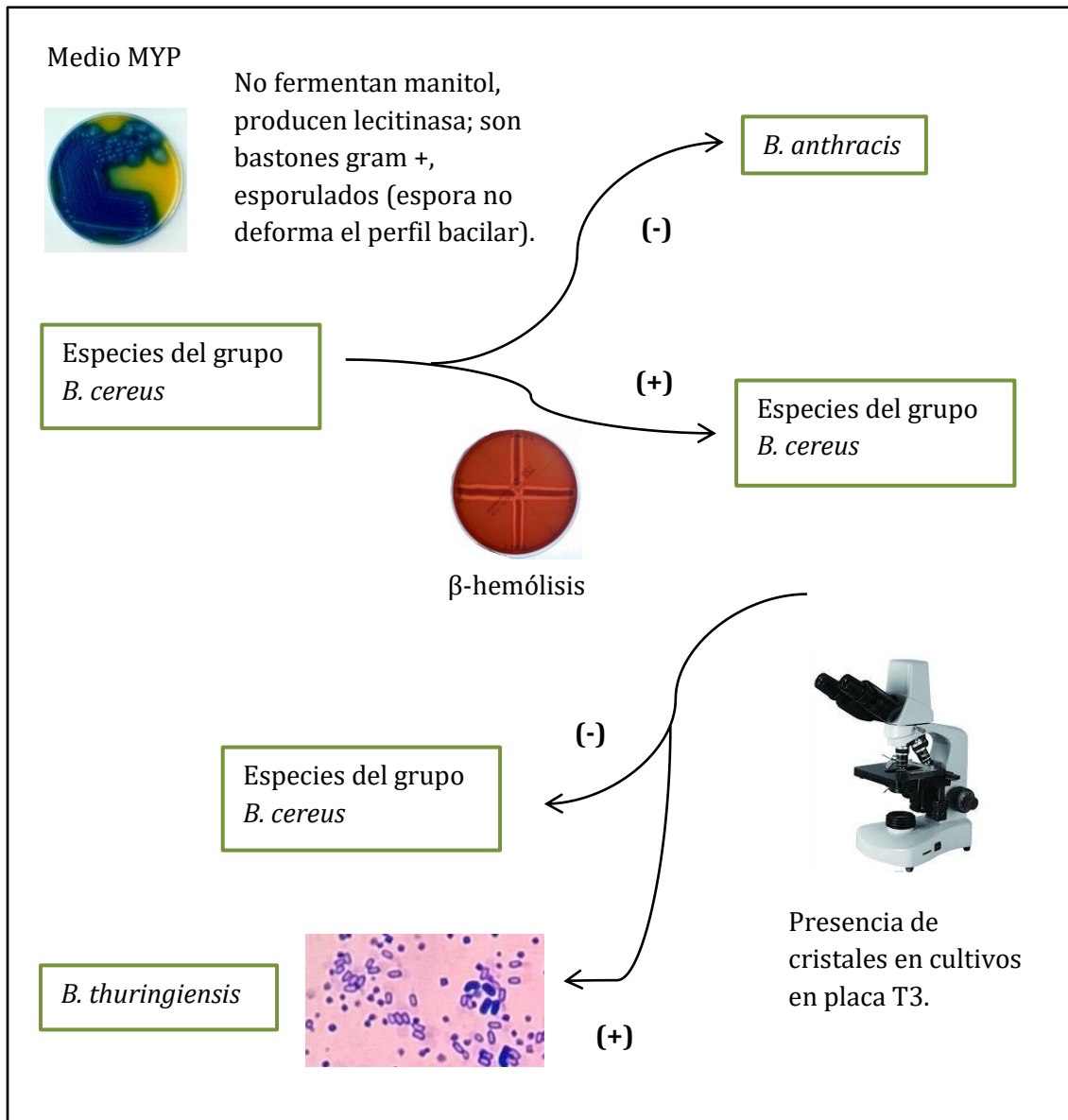


Figura 5: Esquema de identificación de *Bacillus thuringiensis* diseñado en base a las características de las especies del grupo *Bacillus cereus* descritas en el Bergey's Manual of Systematic bacteriology 2009.

3.2 Construcción de un cepario de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.

Luego de confirmada la presencia de cristales mediante observación microscópica, se realizaron cultivos de todas las cepas en tubo de T3 inclinado con tapa de rosca y se guardaron en cámara de frío a 4 °C.

3.3 Selección de las cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros.

3.3.1 Extracción de ADN mediante lisis celular.

Se realizó una lisis celular según Juárez-Pérez y Ferrandis (1997) con modificaciones. A partir de un cultivo en placa de T3 de 12-14 h de incubación (para evitar que las células hubiesen esporulado) a 28 °C, se realizó una suspensión de una ansada del cultivo en 100 µL de H₂O miliQ, se calentó a 100 °C durante 10 min en un bloque térmico (Accublock™ Mini, Labnet International, Inc.), se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se utilizó directamente para realizar la reacción de PCR.

3.3.2 Amplificación de genes cry.

La amplificación de las regiones correspondientes a los genes cry 1 (277 pb) y cry 2 (701 pb) se realizó según Ben-Dov y col. (1997). Los primers utilizados provinieron de Macrogen Inc. (Korea): para cry 1 fueron Un1(d) (5'-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3') y Un1(r) (5'-TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT-3') y para cry 2 Un2(d) (5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3') y Un2(r) (5'-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT-3'). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 2,5 µL de Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canadá), 12,3 µL de H₂O miliQ estéril, 1,5 µL de MgCl₂, 0,5 µL de cada primer 25 µM, 2,5 µL de dNTPs 2 mM, 0,2 µL de Taq polimerasa 5 U/µL (Fermentas International Inc., Canadá) y 5 µL de ADN proveniente del sobrenadante descrito en la sección 3.3.1. Para el gen cry 1, la amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 94 °C 1 min, 54 °C 50 seg, 72 °C 90 seg y una extensión final de 72 °C 5 min. La amplificación fue realizada en un termociclador MultiGene Mini Labnet International, Inc. (Edison, NJ, USA). Para el gen cry 2, la amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 94 °C 1 min, 45 °C 45 seg, 72 °C 2 min y una extensión final de 72 °C 10 min. Cada reacción se realizó con un control negativo, sin ADN en el que se completó el volumen con H₂O miliQ, y un control positivo, con ADN de la cepa *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* NRRL HD-1 de la colección del ARS USDA. A su vez, se realizaron controles

de amplificación para verificar la ausencia de inhibidores en las soluciones obtenidas a partir de cada lisis celular usada para la amplificación de genes cry. En forma paralela a la amplificación de genes cry y a partir de la misma solución de lisado celular, se realizó una PCR para amplificar el gen groEL (400 pb) el cual es específico del grupo *Bacillus cereus* y por lo tanto debe estar presente en todas las bacterias del grupo (Park y col. (2007)). Los primers utilizados provinieron de Macrogen Inc. (Korea): BCGSH-1F(d) (5'-GTGCGAACCCAATGGGTCTTC-3') y BCGSH-1R(r) (5'-CCTTGTTGTACCACTTGCTC-3'). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 2,5 µL de Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canadá), 12,3 µL de H₂O miliQ estéril, 1,5 µL de MgCl₂, 0,5 µL de cada primer 25 µM, 2,5 µL de dNTPs 2 mM, 0,2 µL de Taq polimerasa 5 U/µL (Fermentas International Inc., Canadá) y 5 µL de ADN proveniente del sobrenadante descrito en la sección 3.3.1. La amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 94 °C 30 seg, 63 °C 30 seg, 72 °C 30 seg y una extensión final de 72 °C 5 min.

Los productos de PCR fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) al 1,2 %, con Gel Red como indicador a una concentración final de 50X en cada muestra. El gel se observó bajo una lámpara UV de longitud de onda media, alrededor de 300 nm (Sambrook and Russell 2001). El tamaño de los amplicones fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá). Se consideró que un aislamiento no contenía genes cry 1 ó cry 2 si no se obtenía amplificación de dichos genes pero sí se obtenía amplificación del gen groEL a partir del mismo lisado celular.

3.4 Selección de la cepa que presente mayor actividad contra *Pseudaletia adultera* mediante ensayos *in vivo*.

3.4.1 Preparación de los inóculos a aplicar a la dieta de *P. adultera*.

A medida que se fueron realizando los diferentes ensayos, se introdujeron algunas variantes en el procedimiento de preparación de los inóculos a ser aplicados sobre la dieta de *P. adultera* (Tabla 1), de manera de poder optimizar la producción de

cristales por parte de las cepas y para estandarizar los inóculos a utilizar en cada ensayo.

En todos los ensayos se preparó un inóculo con la cepa *B. thuringiensis* de la formulación comercial Dimy Pel® (Dimy productos para jardinería Ltda; Industria brasileira) para utilizar como control positivo.

Al principio del trabajo, se prepararon matraces de 250 mL con 50 mL de caldo T3 estéril, se inocularon con una ansada de cultivo de las cepas que se deseaba evaluar y se incubaron a 28 °C, con agitación a 150 rpm, durante 5 días, para permitir que la mayor parte de las células lisara y expulsara las esporas y los cristales (Procedimiento 1 en Tabla 1).

Luego se hizo un frotis a partir de cada matraz, se tiñó con Azul de Coomassie y se observó al microscopio óptico por inmersión para corroborar la presencia de esporas y cristales, y la ausencia de contaminación.

El contenido de cada matraz se repartió en dos tubos de 50 mL, se centrifugó a 4500 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 20 mL de agua estéril. Este paso se repitió dos veces. Finalmente se resuspendió el pellet de los dos tubos en un volumen final de 10 mL de agua estéril. La suspensión de esporas y cristales obtenida se utilizó para inocular la dieta de las larvas (Bozlagan, Ayvaz et al. 2010).

3.4.1.1 Medida de la concentración de proteínas por método de Bradford.

En los primeros cuatro ensayos (Procedimiento 1 en Tabla 1) a partir de la suspensión de esporas y cristales, se midió la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford 1976; Pérez-Guerrero, Aldebis et al. 2012; Liao, Gao et al. 2015), midiendo absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6715 UV/Vis).

3.4.1.2 Recuento microscópico directo de esporas y cristales, y estandarización de los inóculos.

A partir del quinto ensayo se realizó la estandarización de los inóculos de acuerdo a la concentración de cristales. A partir de 1 µL de la suspensión de esporas y cristales obtenida según lo explicado en el punto 3.4.1, se realizó un frotis en un

área de 1 cm² del portaobjeto, se tiñó con Azul de Coomassie y se observó por inmersión al microscopio óptico. Se contó la cantidad de esporas y cristales en cinco campos de observación diferentes de área conocida, y se calculó la concentración de esporas y cristales de cada inóculo en esporas/μL y cristales/μL respectivamente. Este procedimiento se hizo por triplicado y los cálculos finales se realizaron promediando los datos obtenidos. Finalmente, se estandarizaron por dilución todos los inóculos a una concentración de 1 x 10⁶ cristales/μL (Procedimiento 2 en Tabla 1).

Por último, a partir del séptimo ensayo, se realizó otra modificación en el protocolo, esta vez al principio del procedimiento de preparación de los inóculos de la dieta larval. Los matraces con caldo T3 utilizados para realizar el cultivo líquido de las cepas, fueron inoculados con 1 mL de suspensión Mc Farland 1 de las cepas a evaluar en suero fisiológico estéril, en lugar de utilizar una ansada como se hizo previamente. El resto del procedimiento se mantuvo (Procedimiento 3 en Tabla 1).

Tabla 1: Esquema de las modificaciones realizadas en el proceso de optimización de la preparación de los inóculos a utilizar en los ensayos *in vivo*. (*)

	P1	P2	P3
Inoculación de matraces con una ansada de las cepas.	X	X	
Inoculación de matraces con 1mL de suspensión McFarland 1 de las cepas.			X
Incubación a 28 °C durante 5 días con agitación.	X	X	X
Observación al microscopio para descartar contaminación.	X	X	X
Centrifugado, lavado y resuspensión.	X	X	X
Medida de concentración de proteínas.	X		
Recuento microscópico directo y estandarización a 1 x 10 ⁶ cristales/μL.		X	X
Inoculación de la dieta.	X	X	X

*El procedimiento 1 (P1) se realizó en los ensayos 1-4; el procedimiento 2 (P2) en los ensayos 5 y 6; y el procedimiento 3 (P3) se realizó en los ensayos 7-13.

3.4.2 Bioensayos contra larvas de *Pseudaletia adultera*.

Se utilizaron larvas de *Pseudaletia adultera* de una colonia establecida y mantenida por el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química sobre dieta artificial (Monnerat, Batista et al. 2007).

Se realizaron ensayos *in vivo* contra larvas en 3° estadio, alimentadas con dieta artificial tratada superficialmente con 500 µL de los distintos inóculos. Los inóculos se aplicaron homogéneamente sobre un trozo de dieta solidificada (de 2 cm de lado aproximadamente) y se dejó secar antes de colocar las larvas. Se realizaron 12 réplicas por cada tratamiento. Como control positivo se realizó un tratamiento con la cepa de *Bacillus thuringiensis* aislada a partir de la formulación Dimy Pel®. Y se realizó como control negativo un tratamiento con agua estéril en lugar del inóculo. Cada larva se colocó en una placa de Petri estéril con dieta y papel estéril (Figura 6). Se controló mortalidad cada 24-48 h hasta la emergencia de los adultos. Las condiciones de los ensayos fueron las mismas que las del mantenimiento de la colonia: temperatura de 21 ± 1 °C, humedad de 60 ± 10 % y un fotoperíodo de 14:10 h de luz/oscuridad.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Minitab® Statistical Software. Los resultados de mortalidad de las larvas se analizaron mediante tests estadísticos de Chi cuadrado (χ^2), Modelos Lineales Generalizados y mediante curvas de sobrevivencia con el método de Kaplan-Meier. Se evaluaron además los efectos sub-letales mediante tests de Chi cuadrado (χ^2) y Modelos Lineales Generalizados, tomando como indicador el éxito de las larvas en llegar al estado adulto.



Figura 6: Placa de Petri (8,5 cm de diámetro) estéril con larva de *Pseudaletia adultera* alimentada con dieta artificial tratada con inóculo.

4. Resultados

4.1 Aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo.

Con el método de aislamiento selectivo se obtuvieron 144 aislamientos correspondientes al grupo *Bacillus cereus* sensu lato. Ocho aislamientos dieron negativo en la prueba de β -hemólisis, por lo cual fueron descartados. En la figura 7 se observa una placa de Agar-sangre con 7 cepas sembradas, en la cepa S10(2) se observa una clara β -hemólisis positiva.

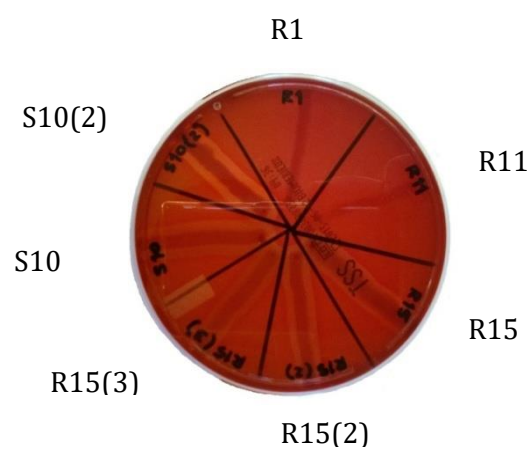


Figura 7: Placa de Agar-sangre con siete aislamientos sembrados, donde se observa una clara β -hemólisis positiva para la cepa S10(2) (se observa el halo transparente de hemólisis alrededor de la línea de sembrado).

Los 136 aislamientos restantes fueron observados por inmersión al microscopio óptico con tinción de Azul de Coomassie, y en 114 de éstos se encontraron cristales correspondientes a la especie *Bacillus thuringiensis*. En la figura 8 se muestran imágenes de algunos de ellos.

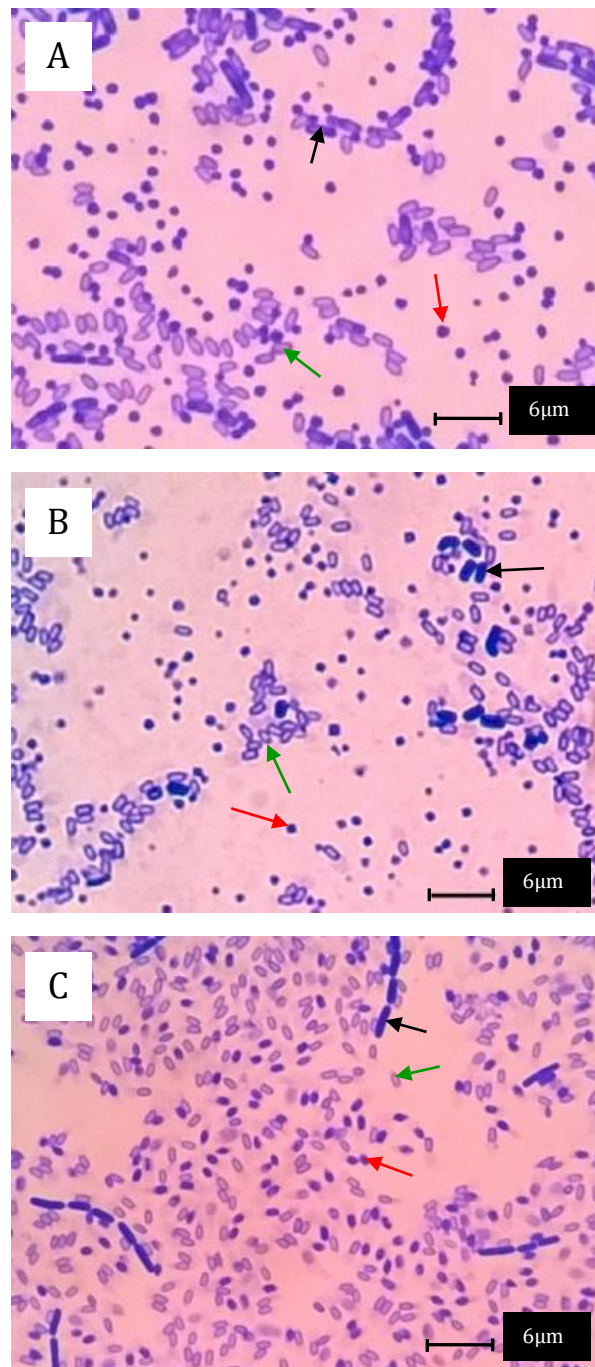


Figura 8: Fotos tomadas al microscopio óptico con aumento 1000 X de frotis teñidos con Azul de Coomassie realizados a tres aislamientos: Tt 3 en (A); Tt 16(2) en (B); M7A en (C); en las que se observan células (flechas negras), esporas (flechas verdes) y cristales (flechas rojas) característicos de la especie *B. thuringiensis*.

En todos los departamentos muestreados en el presente trabajo, se constató la presencia de *B. thuringiensis* a partir de las muestras de suelo analizadas. Los aislamientos correspondientes a *B. thuringiensis* presentaron una amplia distribución geográfica, lo cual se observa al calcular los porcentajes correspondientes a los distintos departamentos de los cuales se tomaron las muestras de suelo (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados del porcentaje de muestras con al menos un aislamiento correspondiente a *B. thuringiensis*, porcentaje de aislamientos con cry 1 y cry 2 por separado, según el departamento de procedencia y el número de muestras de suelo.

Departamento	n° de muestras de suelo	% de muestras con al menos un Bt	% de aislamientos con cry 1	% de aislamientos con cry 2
Maldonado	10	80 %	0 %	0 %
Rivera	10	80 %	6,0 %	0 %
Lavalleja	20	45 %	2,4 %	1,2 %
Rocha	20	95 %	1,2 %	0 %
Salto	20	75 %	7,2 %	1,2 %
Treinta y Tres	30	80 %	10,8 %	2,4 %
Total	110	75,4 %	27,7 %	4,8 %

4.2 Selección de las cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros.

La presencia de genes cry 1 y cry 2 se analizó en un aislamiento por cada muestra de suelo, es decir, un total de 83 aislamientos. 22 dieron positivo en la amplificación del gen cry 1, 3 dieron positivo en la amplificación del gen cry 2, y uno dio positivo para ambos genes (Tabla 3), resultando en un total de 26 cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros de acuerdo al perfil de genes cry analizado. En la búsqueda de genes cry mediante PCR, se realizó en paralelo otra reacción con primers que amplifican para el gen groEL que es específico de bacterias del grupo *Bacillus cereus*, de manera de poder verificar que el producto del lisado no hubiera inhibido la amplificación con los primers específicos para cry 1 y/o cry 2, en caso de amplificación negativa (Figura 9).

Tabla 3: Resultados de la amplificación de los genes cry 1 y cry 2. (+) indica presencia del gen; (-) indica ausencia del gen. (*)

Cepa	Departamento	cry 1	cry 2	Actividad contra larvas
S2A	Salto	+	-	Larvicida
S3A	Salto	+	+	Larvicida
S6A	Salto	+	-	ND
S8T	Salto	+	-	NE
S11	Salto	+	-	ND
S12	Salto	+	-	ND
M4A	Lavalleja	-	+	Larvicida
M7A	Lavalleja	+	-	ND
M8	Lavalleja	+	-	Subletal
Tt 4	Treinta y Tres	+	-	ND
Tt 14	Treinta y Tres	+	-	ND
Tt 16	Treinta y Tres	+	-	NE
Tt 18	Treinta y Tres	+	-	ND
Tt 19	Treinta y Tres	+	-	ND
Tt 20	Treinta y Tres	+	-	ND
Tt 23	Treinta y Tres	+	-	Subletal
Tt 25	Treinta y Tres	-	+	Larvicida
Tt 27(2)	Treinta y Tres	+	-	ND
Tt 29(2)	Treinta y Tres	-	+	ND
Tt 30	Treinta y Tres	+	-	ND
Riv 1	Rivera	+	-	ND
Riv 3	Rivera	+	-	NE
Riv 4	Rivera	+	-	ND
Riv 7	Rivera	+	-	ND
Riv 9	Rivera	+	-	ND
R15(3)	Rocha	+	-	NE

*Se indica el departamento de procedencia de cada cepa y la actividad contra larvas en los bioensayos realizados (ND: no detectada; NE: no ensayada).

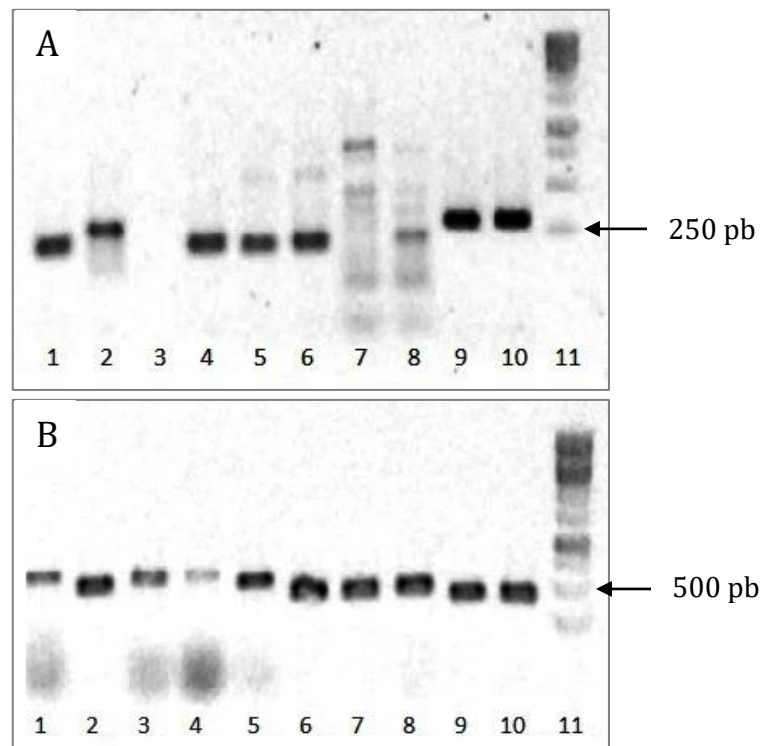


Figura 9: Fotos de los geles de agarosa de los resultados de las reacciones de PCR con primers para el gen cry 1 (A) y para el gen groEL (B) específico para especies del grupo *Bacillus cereus*. Carriles: 1- S2A; 2- S3A; 3- Tt 25; 4- S6A; 5- Riv 1; 6- Riv 3; 7- M4A; 8- M8; 9- Bt formulación; 10- HD-1 (cepa de colección); 11- Marcador de peso molecular 1Kb.

4.3 Selección de la cepa que presente mayor actividad contra *Pseudaletia adultera* mediante ensayos *in vivo*.

Se realizaron 13 ensayos en total. Los primeros cuatro ensayos se efectuaron con el protocolo inicial (Procedimiento 1 en Tabla 1). Los ensayos 5 y 6 se realizaron en base al mismo protocolo con el agregado de la estandarización de los inóculos (Procedimiento 2 en Tabla 1). Finalmente, los ensayos 7-13 se realizaron con el protocolo final (Procedimiento 3 en Tabla 1).

Los resultados de los ensayos 1-4 no se presentan porque las concentraciones de los inóculos que se utilizaron para tratar la dieta de las larvas, no fueron previamente estandarizadas, de manera que no es posible comparar los resultados obtenidos a partir de ellos.

A continuación se presentan los resultados de los ensayos 5-13, es decir, aquellos ensayos en los cuales los inóculos que se aplicaron sobre la dieta fueron

previamente estandarizados en 1×10^6 cristales/ μL , mediante recuento microscópico directo. En el ensayo 10, por única vez se evaluó una cepa a mayor concentración, la cepa Tt 25 bajo la notación “Tt 25+” que se utilizó a una concentración de $2,42 \times 10^6$ cristales/ μL .

El screening sistemático constó entonces de nueve ensayos que incluyeron un total de 22 aislamientos, la cepa *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* NRRL HD-1 y los controles positivo y negativo correspondientes.

4.3.1 Mortalidad de larvas al final de los ensayos.

Los resultados de mortalidad de larvas (N=12 por tratamiento) al final de los ensayos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Mortalidad de larvas (N=12 por tratamiento) al final de los ensayos (N=9, Ensayos 5-13) realizados contra *Pseudaletia adultera*. Bt refiere a la cepa de *B. thuringiensis* de la formulación Dimy Pel® utilizada como control positivo; C (-) al control negativo.

Cepas	Ensayo								
	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Bt	10	9	12	12	11	11	9	10	12
C (-)	3	3	4	2	0	0	2	2	2
S3A	0								9
Tt 18	1		2				0		
M7A		5					3		
S2A			2					8	6
S6A			3						
Riv 1			4						
S11			0						
Tt 20			5		1				
Tt 23			5		2				
Tt 29(2)			2						
Riv 4				1					
Riv 7				4			2		
Riv 9				2					
Tt 4				2					
Tt 27(2)				3					
M8					1				
Tt 19					3				
Tt 25					4	8	4		4
Tt 30					1				
Tt 25 +						8			

M4A						9	4		2
Tt 14						4			
HD-1							4		12
S12								3	

Al comparar por un lado los resultados de los controles negativos utilizados entre ensayos y por otro los de los controles positivos utilizados entre ensayos, mediante test de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson, no se observaron diferencias significativas (Tabla 5), indicando homogeneidad entre ensayos. En el conjunto de los ensayos, la mortalidad de larvas para los controles negativos fue de 2 ± 1 y de $11 \pm 1,2$ para los controles positivos (Figura 10). Asimismo la comparación entre la mortalidad de larvas en los controles negativos contra la de los controles positivos dio diferencias significativas (Chi-cuadrado = 121,709; DF = 17; $p < 0,001$) indicando capacidad de detección en nuestro ensayo de la actividad larvicida de la cepa de *B. thuringiensis* utilizada como control positivo.

Tabla 5: Comparación de los valores de mortalidad de los controles positivos y negativos entre ensayos, mediante test de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson. DF= grados de libertad; p= valor p.

	χ^2	DF	p
Comparación entre controles negativos	8,400	8	0,395
Comparación entre controles positivos	10,125	8	0,256

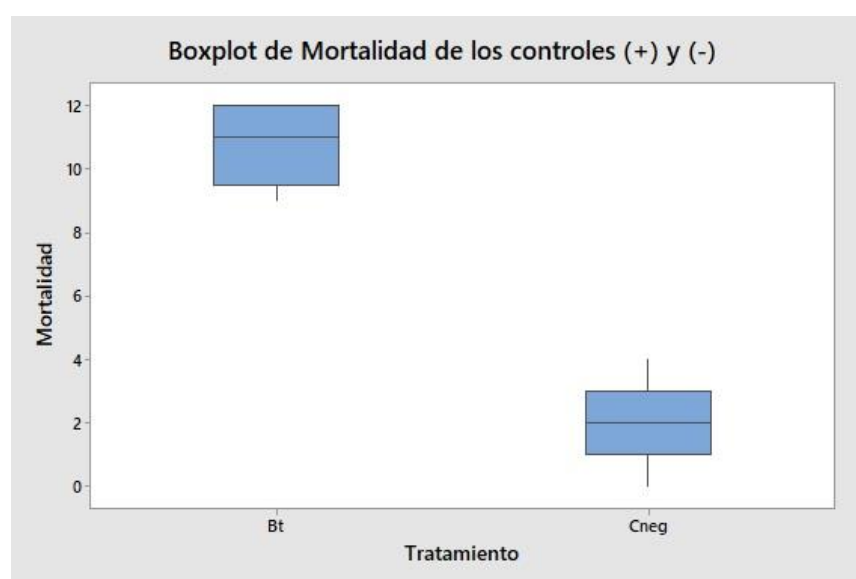


Figura 10: Mortalidad de los controles positivos y negativos en los distintos ensayos (N = 9) realizados.

Los resultados de mortalidad de las cepas evaluadas se analizaron para cada ensayo mediante test de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson (Tabla 6). Se compararon los resultados de los tratamientos de cada ensayo con el control negativo correspondiente, sin incluir los controles positivos ni el HD-1 (Ensayo 13) en este análisis.

Tabla 6: Análisis mediante test de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson de los resultados de mortalidad de los tratamientos realizados en cada bioensayo comparados con el control negativo correspondiente. DF= grados de libertad.

Ensayo (cepas incluidas*)	χ^2	DF	p
Ensayo 5 (S3A; Tt 18)	3,938	2	0,140
Ensayo 6 (M7A)	0,750	1	0,386
Ensayo 7 (S2A; S6A; Tt 18; Riv 1; S11; Tt 20; Tt 23; Tt 29(2))	9,778	8	0,281
Ensayo 8 (Riv 4; Riv 7; Riv 9; Tt 4; Tt 27(2))	2,837	5	0,725
Ensayo 9 (Tt 20; Tt 23; M8; Tt 19; Tt 25; Tt 30)	7,778	6	0,255
Ensayo 10 (Tt 25; Tt 25+; M4A; Tt 14)	18,954	4	0,001
Ensayo 11 (HD-1; Tt 18; M7A; Riv 7; Tt 25; M4A)	6,394	6	0,381
Ensayo 12 (S2A; S12)	7,465	2	0,024
Ensayo 13 (S2A; S3A; Tt 25; M4A)	12,409	4	0,015

*En todos los ensayos se incluyó el control negativo correspondiente.

De los nueve ensayos realizados, en tres de ellos se detectaron diferencias significativas entre la mortalidad de las larvas en los distintos tratamientos y el control negativo: Ensayo 10 (valor p = 0,001); Ensayo 12 (valor p = 0,024) y Ensayo 13 (valor p = 0,015). Dichas diferencias indicarían que las cepas utilizadas en estos tres ensayos podrían tener un efecto en la mortalidad de las larvas.

A continuación, se muestran los resultados del análisis de los Ensayos 10, 12 y 13 mediante Modelos Lineales Generalizados (MLG) para determinar si existen diferencias entre las medias de mortalidad de cada tratamiento respecto al control negativo. La media se define como el número de muertes sobre el total de larvas (N=12) por tratamiento.

Se utilizó el método de Dunnett de comparaciones múltiples para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre las medias. Este método crea

intervalos con un 95 % de confianza para las diferencias entre las medias de cada factor y la media de un grupo de control, en este caso el control negativo correspondiente. Si un intervalo contiene el cero, no hay diferencia significativa entre la media del factor y la media del control (Tabla 7).

Tabla 7: Análisis mediante Modelos Lineales Generalizados (MLG) de las medias (n° de larvas muertas sobre el total de larvas, N=12 por tratamiento) de los tratamientos de los Ensayos 10, 12 y 13 mediante el método de Dunnett con un 95 % de confianza. (*)

Ensayo	Cepa	p	Media	Agrupamiento
Ensayo 10	M4A	<0,001	0,750	B
	Tt 14	0,064	0,333	A
	Tt 25	<0,001	0,667	B
	Tt 25+	<0,001	0,667	B
	C (-)		0,000	A
Ensayo 12	S2A	0,010	0,667	B
	S12	0,651	0,250	A
	C (-)		0,167	A
Ensayo 13	HD-1	<0,001	1,000	B
	S2A	0,052	0,500	A
	S3A	0,001	0,750	B
	Tt 25	0,326	0,333	A
	M4A	1,000	0,167	A
	C (-)		0,167	A

*Las medias que no están en el agrupamiento "A" son significativamente diferentes de la media del control.

En el Ensayo 10 las cepas M4A, Tt 25 y Tt 25+ presentaron diferencias significativas con el control negativo. No se observaron diferencias entre Tt 25 y Tt 25+, que corresponden a la misma cepa evaluada a diferentes concentraciones de cristales/ μL . En el caso del Ensayo 12, es la cepa S2A la que presenta diferencias significativas con el control negativo. Y en el Ensayo 13 la mortalidad causada por la cepa S3A es significativamente diferente de la del control negativo.

Finalmente se comparó la mortalidad de las cepas de estos tres ensayos contra la mortalidad de los controles positivos, y todos presentaron diferencias significativas con la cepa utilizada en la formulación comercial (Ensayo 10: $p = 0,045$; Ensayo 12: $p = 0,012$ y Ensayo 13: $p < 0,001$).

4.3.2 Análisis de mortalidad por curvas de Supervivencia de Kaplan Meier.

Los resultados de mortalidad de las larvas también se analizaron en función del tiempo mediante curvas de supervivencia con el método de Kaplan-Meier (Despa).

El análisis de mortalidad por curvas de supervivencia calcula el MTTF (*Mean Time To Failure*), la mediana y el IQR (*Inter Quartile Range*). El MTTF es el tiempo promedio para fallar. En este análisis, la muerte de la larva es lo que se considera como la “falla”. La mediana es el valor central del conjunto de datos ordenados, en este caso, el valor central del tiempo transcurrido durante el ensayo medido en días. Y el IQR es el rango intercuartílico, es una estimación estadística de la dispersión de una distribución de datos; consiste en la diferencia entre el tercer y el primer cuartil, de manera que el 50 % de los datos está dentro de este rango. A medida que aumenta la dispersión de los datos, el IQR es mayor. Mediante esta medida se eliminan los valores extremadamente alejados (Minitab Inc. (2016). “*Descriptive Statistics*”, *Minitab Express™ Support*, www.minitab.com).

Al comparar las curvas de supervivencia de los controles positivos de todos los ensayos, observamos que presentan diferencias significativas entre ensayos (Test de Wilcoxon, Chi-cuadrado = 31,56; DF = 8; $p < 0,001$; Figura 11; Tabla 8).

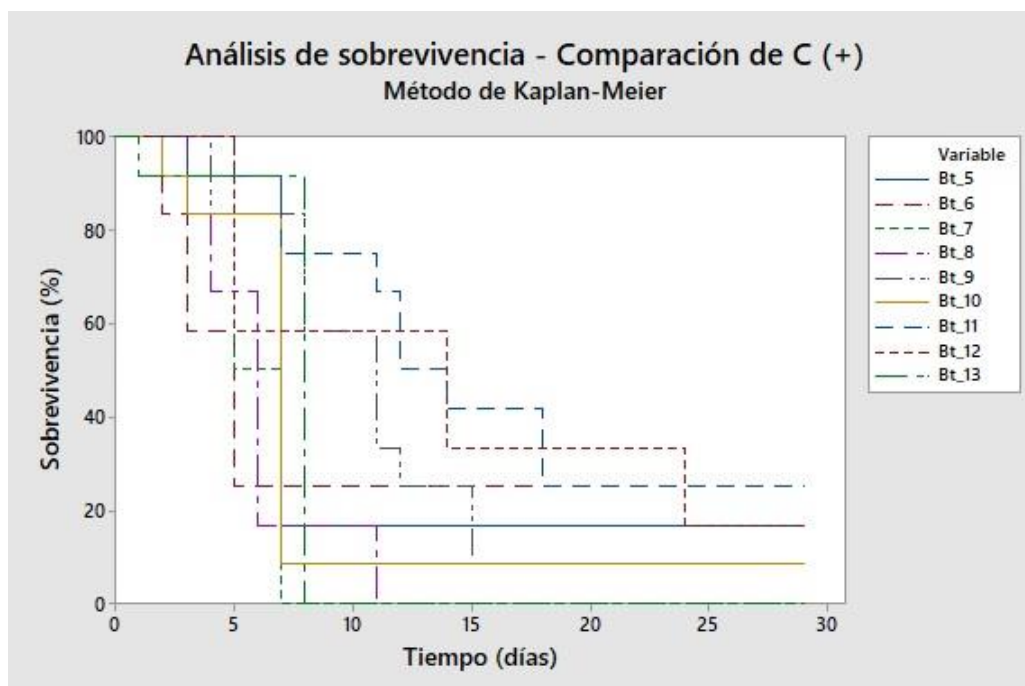


Figura 11: Curvas de supervivencia por el método de Kaplan-Meier de los controles positivos utilizados en los distintos ensayos.

Tabla 8: Estadísticos obtenidos en el análisis de sobrevivencia de las curvas de los controles positivos de los ensayos. MTTF = tiempo promedio para fallar \pm error estándar; IQR = rango intercuartílico.

Controles (+)	MTTF	Mediana del tiempo (días)	IQR
Bt_5	10,17 \pm 2,44	7	0
Bt_6	8,5 \pm 2,57	5	2
Bt_7	5,83 \pm 0,39	5	2
Bt_8	6 \pm 0,76	6	2
Bt_9	11,33 \pm 1,91	11	4
Bt_10	7,58 \pm 1,49	7	0
Bt_11	15,67 \pm 2,46	12	11
Bt_12	13,58 \pm 2,49	14	19
Bt_13	7,42 \pm 0,58	8	0

Los Ensayos 11 y 12 presentan los valores más altos de rango intercuartílico (IQR) y por lo tanto, la mayor dispersión de datos.

Si bien todos los controles positivos provocaron mortalidad de forma similar en cuanto a resultados finales, las diferencias observadas en el análisis de mortalidad en función del tiempo indicarían que lo logran a diferentes velocidades.

Por otra parte, se realizó la comparación de las curvas de sobrevivencia de los controles negativos, excepto los correspondientes a los Ensayos 9 y 10 en los cuales no se registraron muertes, y no se observan diferencias significativas (Test de Wilcoxon, Chi-cuadrado = 1,056; DF = 6; p = 0,983, Figura 12). En los Ensayos 5 y 6 se registraron 3 muertes en los controles negativos, en el Ensayo 7, 4 muertes en el control negativo, y en los ensayos 8, 11, 12 y 13, se registraron 2 muertes en los controles negativos, lo que se traduce en pocos eventos de “falla” para el análisis, por lo tanto, no es posible calcular la mediana ni el IQR (Tabla 9). Este análisis sugiere que los controles negativos se comportaron como tales por lo que se validaría el bioensayo usado.

Tabla 9: Análisis de las curvas de supervivencia de los controles negativos de los ensayos, excepto los Ensayos 9 y 10 en los cuales no se registraron muertes en los controles negativos. MTTF = tiempo promedio para fallar \pm error estándar.

Controles (-)	MTTF
C (-)_5	24,75 \pm 2,00
C (-)_6	20,08 \pm 2,36
C (-)_7	31,92 \pm 3,26
C (-)_8	24,83 \pm 1,77
C (-)_11	24,58 \pm 2,70
C (-)_12	21,58 \pm 2,02
C (-)_13	24,42 \pm 2,10

*No fue posible calcular la mediana ni el IQR ya que los controles negativos de los ensayos registraron pocas muertes (C(-)_5 = 3; C(-)_6 = 3; C(-)_7 = 4; C(-)_8 = 2; C(-)_11 = 2; C(-)_12 = 2; C(-)_13 = 2).

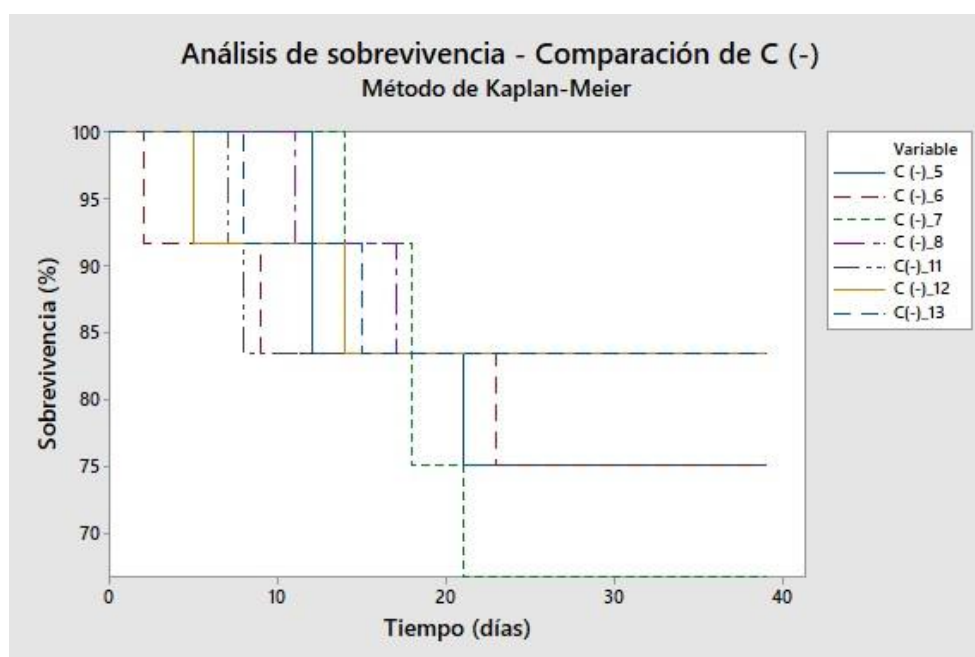


Figura 12: Curvas de supervivencia de los controles negativos utilizados en los distintos ensayos, excepto los Ensayos 9 y 10 en los que no se registraron muertes en los controles negativos correspondientes.

Al comparar las curvas de supervivencia de todos los tratamientos en cada ensayo por la prueba de Wilcoxon (Tabla 10), observamos en todos los ensayos un valor $p < 0,05$ lo cual indicaría que existen diferencias significativas. Al realizar

nuevamente la comparación excluyendo los valores correspondientes a los controles positivos, el valor $p < 0,05$ se mantiene sólo en los Ensayos 10, 12 y 13. Es decir, que las curvas de sobrevivencia de las cepas evaluadas en los demás ensayos, no presentan diferencias significativas con las curvas de sobrevivencia de los controles negativos correspondientes.

Tabla 10: Resultados de la comparación de las curvas de sobrevivencia de todos los ensayos (N=9) por el método de Wilcoxon. DF = grados de libertad.

Ensayo (cepas incluidas*)	Análisis comparativo**	χ^2	DF	p
Ensayo 5 (S3A; Tt18)	Todos los tratamientos	35,05	3	0,000
	Sin Bt	4,24	2	0,120
Ensayo 6 (M7A)	Todos los tratamientos	7,85	2	0,020
	Sin Bt	0,93	1	0,335
Ensayo 7 (S2A; S6A; Tt 18; Tt 20; Tt 23; Tt 29(2); Riv 1; S11)	Todos los tratamientos	144,43	9	0,000
	Sin Bt	9,21	8	0,325
Ensayo 8 (Riv 4; Riv 7; Riv 9; Tt 4; Tt 27(2))	Todos los tratamientos	66,40	6	0,000
	Sin Bt	3,27	5	0,659
Ensayo 9 (M8; Tt 19; Tt 20; Tt23; Tt 25; Tt 30)	Todos los tratamientos	53,79	7	0,000
	Sin Bt	8,06	6	0,234
Ensayo 10 (M4A; Tt 14; Tt25; Tt 25+)	Todos los tratamientos	34,93	5	0,000
	Sin Bt	14,04	4	0,007
Ensayo 11 (HD-1; M4A; M7A; Tt 18; Tt 25; Riv 7)	Todos los tratamientos	18,85	7	0,009
	Sin Bt	6,42	6	0,378
Ensayo 12 (S2A; S12)	Todos los tratamientos	15,49	3	0,001
	Sin Bt	9,21	2	0,010
Ensayo 13 (HD-1; S2A; S3A; Tt 25; M4A)	Todos los tratamientos	50,24	6	0,000
	Sin Bt	34,38	5	0,000
	Sin Bt y sin HD-1	14,29	4	0,006

*En todos los ensayos se incluyó la cepa *B. thuringiensis* de la formulación comercial como control positivo y el control negativo.

**El análisis comparativo de las curvas de sobrevivencia de cada ensayo, primero se realiza con todos los tratamientos y luego sin el control positivo.

En el Ensayo 13, se realizó una tercera comparación de las curvas de sobrevivencia, quitando los valores de la cepa HD-1, por tratarse de una cepa de colección, y el resultado fue significativo ($p < 0,05$). De esta manera, los Ensayos

10, 12 y 13, son los únicos que presentan diferencias significativas en las curvas de sobrevivencia de las cepas evaluadas en cada uno, respecto al control negativo correspondiente (Tabla 10).

Al observar los valores de MTTF obtenidos en estos tres ensayos (Tabla 11) las diferencias en el Ensayo 10 podrían deberse a la diferencia de valores entre las cepas M4A y Tt 25+ respecto al C (-). En el caso del Ensayo 12, las diferencias encontradas podrían deberse a la diferencia de valores entre la cepa S2A y el C (-). Y finalmente, en el Ensayo 13, las diferencias podrían deberse a la diferencia de valores de MTTF de la cepa S3A y el C (-). Estas diferencias también se observan en los gráficos de las curvas de sobrevivencia correspondientes a estos ensayos (Figuras 13, 14 y 15).

Tabla 11: Estadísticos obtenidos en el análisis de sobrevivencia de las cepas evaluadas en los ensayos en los cuales se encontró diferencias significativas entre las cepas prospectadas y el control negativo. MTTF: tiempo promedio para fallar \pm error estándar.

Cepa	MTTF
Ensayo 10	
Bt_10	7,58 \pm 1,49
M4A_10	14,17 \pm 1,99
Tt 14_10	18,17 \pm 2,22
Tt 25_10	15,92 \pm 1,79
Tt 25+_10	14 \pm 2,29
C (-)_10	> 23
Ensayo 12	
Bt_12	13,58 \pm 2,49
S2A_12	14,33 \pm 2,38
S12_12	22,33 \pm 1,32
C (-)_12	21,58 \pm 2,02
Ensayo 13	
Bt_13	7,42 \pm 0,58
HD-1_13	8,58 \pm 0,58
S2A_13	19,25 \pm 2,54
S3A_13	13,92 \pm 2,42
M4A_13	23,83 \pm 2,50
Tt 25_13	22,42 \pm 2,17
C (-)_13	24,42 \pm 2,10

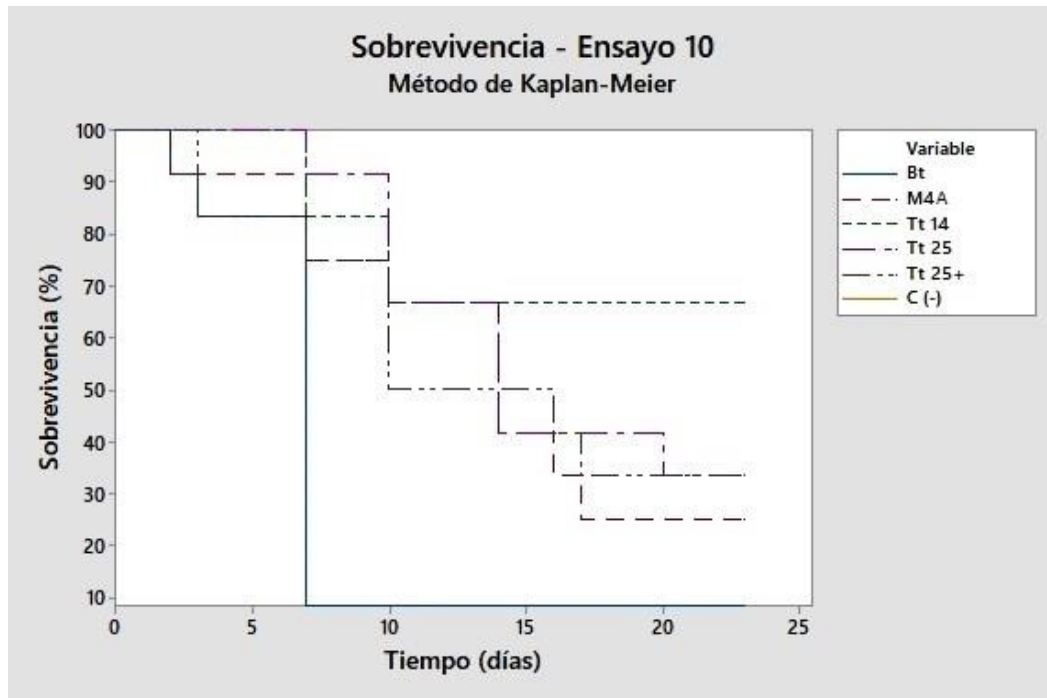


Figura 13: Curvas de sobrevivencia de las cepas evaluadas en el Ensayo 10 (Bt; M4A; Tt 14; Tt 25; Tt 25+; C (-)).

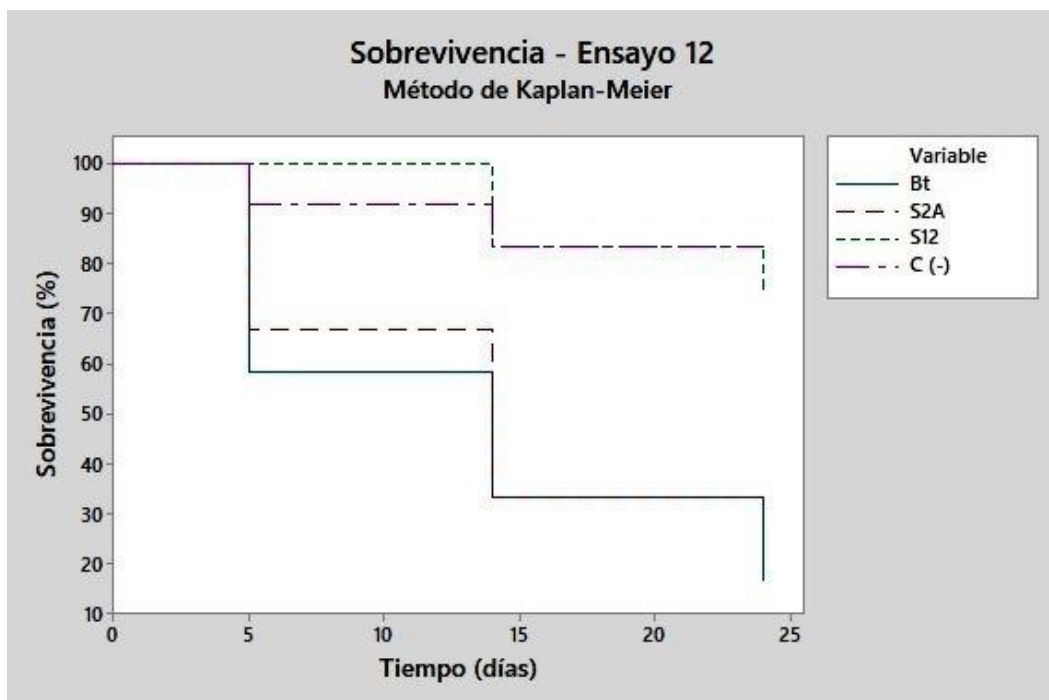


Figura 14: Curvas de sobrevivencia de las cepas evaluadas en el Ensayo 12 (Bt; S2A; S12 y C (-)).

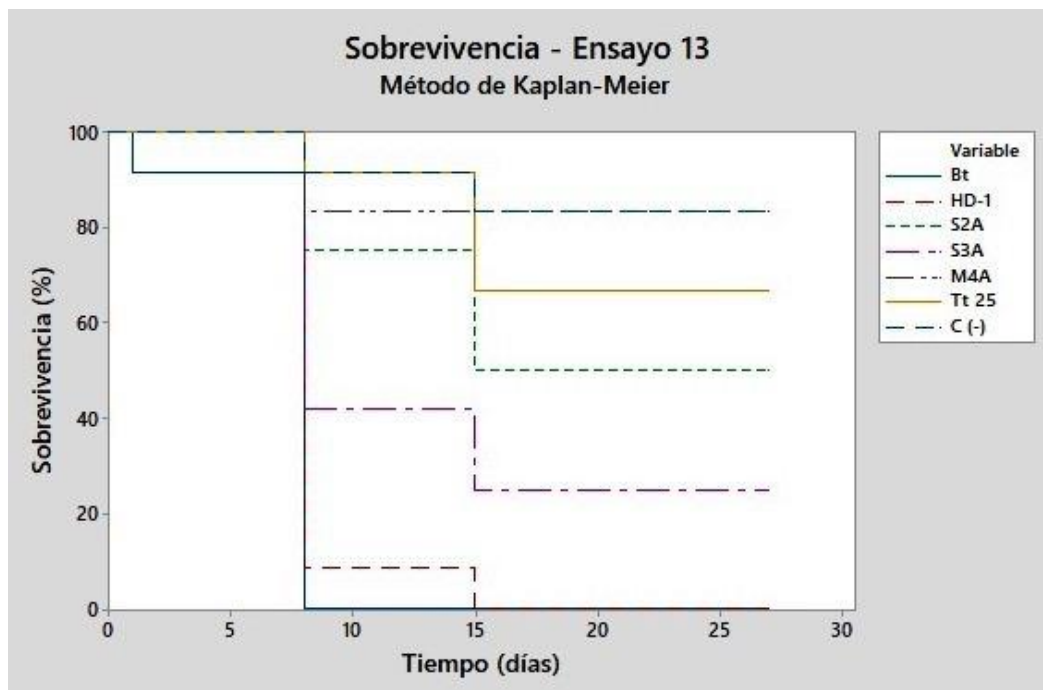


Figura 15: Curvas de supervivencia de las cepas evaluadas en el Ensayo 13 (Bt; HD-1; S2A; S3A; M4A; Tt 25 y C (-)).

4.3.3 Análisis de efectos sub-letales.

Los efectos sub-letales fueron evaluados en base al éxito de las larvas en llegar al estado adulto (es decir aquellas que no murieron en la fase de larva, sino que pasaron por el estado de pupa y finalmente de adulto) mediante test de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson. Se incluyeron en estos análisis los 5 ensayos (Ensayos: 5, 8, 9, 10 y 13) en los cuales el control negativo dio un valor de emergencia de adultos mayor al 50 %. Se registró la proporción de larvas vivas que no fueron capaces de alcanzar el estado adulto (Tabla 12).

Tabla 12: Proporciones de larvas vivas que no alcanzaron el estado adulto (indicado como n° de larvas que sobrevivieron pero no alcanzaron el estado adulto/n° de individuos que sobrevivieron la fase de larva), de aquellos ensayos que presentaron un valor de 50 % de emergencia de adultos o superior en el control negativo.

Cepas	Ensayo 5	Ensayo 8	Ensayo 9	Ensayo 10	Ensayo 13
Bt	2/2	0/0	1/1	1/1	0/0
S3A	2/12				1/3
Tt 18	3/11				
C (-)	2/9	0/10	3/12	2/12	2/10
Tt 20			5/11		
Tt 23			8/10		
Riv 4		4/11			
Riv 7		2/8			
Riv 9		2/10			
Tt 4		2/10			
Tt 27(2)		2/9			
M8			9/11		
Tt 19			3/9		
Tt 25			3/8	0/4	1/8
Tt 25 +				3/4	
Tt 30			1/11		
M4A				1/3	4/10
Tt 14				3/8	
HD-1					0/0
S2A					2/6

Al comparar la tasa de emergencia de adultos en los controles negativos de los ensayos incluidos en este análisis, mediante test de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson, no se observan diferencias significativas (Chi-cuadrado = 2,834; DF = 4; valor p = 0,586). En este caso no se analizaron los controles positivos, ya que al presentar altos valores de mortalidad de larvas (≥ 65 %), no quedaron suficientes individuos como para evaluar un posible efecto sub-lethal.

Por lo tanto, dado que los controles negativos muestran resultados consistentes entre ensayos, se realizó la comparación de la tasa de emergencia de adultos en los tratamientos de cada ensayo (N=5) mediante test de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson (Tabla 13).

Tabla 13: Resultados del análisis de la tasa de emergencia de adultos mediante test de Chi-cuadrado de Pearson. DF= grados de libertad.

Ensayo (cepas incluidas*)	Chi-cuadrado	DF	p
Ensayo 5 (S3A; Tt 18)	0,379	2	0,828
Ensayo 8 (Riv 4; Riv 7; Riv 9; Tt 4; Tt 27(2))	4,365	5	0,498
Ensayo 9 (Tt 20; Tt 23; M8; Tt 19; Tt 25; Tt30)	19,359	6	0,004
Ensayo 10 (Tt 14)**	1,111	1	0,292
Ensayo 13 (S2A; M4A; Tt 25)**	2,103	3	0,551

*En estos ensayos también se incluyó el valor de los controles negativos correspondientes.

** En los ensayos 10 y 13 se descartaron las cepas con alta mortalidad ($\geq 65\%$).

La capacidad de alcanzar el estado adulto fue en forma general similar a la del control negativo, con la excepción del Ensayo 9 (Tabla 13), en el cual, las diferencias encontradas indicarían que las cepas utilizadas en dicho ensayo podrían disminuir la tasa de emergencia de adultos.

Finalmente se realizó un análisis mediante Modelos Lineales Generalizados (MLG) para comparar las medias del efecto sub-letal de las cepas utilizadas en el Ensayo 9 respecto a la media del control negativo, con el objetivo de poder identificar cuál o cuáles cepas son las responsables de las diferencias encontradas en el test de Chi-cuadrado. También se utilizó el método de Dunnett de comparaciones múltiples con un 95 % de confianza para estudiar las diferencias entre las medias de las cepas contra el control negativo. En este caso la media se define como el n° de larvas que sobrevivieron pero no alcanzaron el estado adulto/n° de individuos que sobrevivieron la fase de larva (Tabla 14).

Tabla 14: Resultados del análisis mediante Modelos Lineales Generalizados (MLG) del efecto sub-letal de los tratamientos del Ensayo 9 mediante el método de Dunnett con un 95 % de confianza.

Ensayo	Cepa	p	Media	Agrupamiento
Ensayo 9	M8	0,003	0,818	B
	Tt 19	0,674	0,333	A
	Tt 20	0,277	0,454	A
	Tt 23	0,005	0,800	B
	Tt 25	0,542	0,375	A
	Tt 30	0,397	0,091	A
	C (-)		0,250	A

*Las medias que no están en el agrupamiento “A” son significativamente diferentes de la media del control negativo.

De las seis cepas evaluadas en el Ensayo 9, las cepas M8 y Tt 23 presentan diferencias significativas con el control negativo en la tasa de emergencia de adultos (Tabla 14).

5. Discusión

5.1 Aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo.

El método de aislamiento selectivo utilizado, basado en el desarrollado por Baig y Mehnaz (2010) (explicado en la sección 3.1.1) consta de una primera etapa en la que se incubó la muestra de suelo en NaAcO 0,3 M durante 4 h a 37 °C con agitación lo cual favorece la germinación de las esporas de toda la flora presente en la muestra, excepto las esporas de *B. thuringiensis*, las cuales son incapaces de germinar en dichas condiciones de alta concentración de acetato (Travers, Martin et al. 1987). Posteriormente se calentó a 80 °C durante 10 min para eliminar los microorganismos en estado vegetativo incluidos aquellos que provenían de esporas germinadas en la etapa anterior (Keshavarzi 2008). Finalmente se realizó aislamiento por estría en placa de MYP y se incubó a 28 °C por 24-48 h. La temperatura de incubación de los aislamientos constituyó una modificación importante del método de Baig y Mehnaz (2010) el cual indica incubación a 37 °C. Al principio del trabajo, se realizó la incubación a esta temperatura y se obtuvieron muy pocos aislamientos correspondientes a *B. thuringiensis*. Luego se comenzó a incubar a 28 °C como otros autores sugieren (Travers, Martin et al. 1987; Blibech, Ksantini et al. 2012; Patel, Bhanshali et al. 2013) lo que permitió que se obtuviesen más aislamientos. Este resultado es concordante con lo planteado por Logan y De Vos (2009) y Elsayed y col. (2014) respecto a que la temperatura afecta en gran medida el crecimiento de la bacteria, la esporulación y la producción de cristales, concluyendo que el cultivo de *B. thuringiensis* debe realizarse a una temperatura alrededor de los 30 °C. Asimismo, en estos trabajos se plantea que *B. thuringiensis* no puede producir sus cristales insecticidas característicos cuando es incubado a 37 °C debido a la pérdida del plásmido que contiene los genes que codifican para las δ -endotoxinas, por lo cual los aislamientos obtenidos a esa temperatura no podrían identificarse como tales.

El medio MYP utilizado para el aislamiento primario es un medio selectivo y diferencial, que permite detectar las colonias correspondientes a bacterias del grupo *Bacillus cereus*, con las cuales se prosigue el análisis, según el esquema de identificación planteado (Figura 5). Los aislamientos obtenidos fueron sometidos a una prueba de tamizaje consistente en la determinación de la capacidad de

producir beta hemólisis en agar sangre. Esta prueba permitió descartar posibles aislamientos de *B. anthracis*, única especie del grupo *Bacillus cereus* incapaz de producir beta hemólisis. El descarte inmediato de presuntos aislamientos de esta especie es de suma importancia ya que se trata del agente etiológico del ántrax. Esta enfermedad se origina en humanos por el contacto con esporas de *B. anthracis*. La vía de infección puede ser cutánea y en tal caso, puede tratarse fácilmente con antibióticos o puede producirse una infección respiratoria por inhalación de esporas, la cual es más peligrosa y de progresión más rápida, pudiendo llegar a producirse la muerte del individuo infectado (Henderson, Inglesby et al. 2002; Leppla 2006; Park, Kim et al. 2007; Logan and De Vos 2009).

Las cepas obtenidas del proceso de aislamiento fueron observadas microscópicamente para determinar la presencia de cristales parasporales, característica que identifica inequívocamente a la especie *Bacillus thuringiensis* (Logan and De Vos 2009). La identificación molecular mediante análisis de la secuencia nucleotídica que codifica para el ARNr 16S no es útil en este caso ya que no permite diferenciar las bacterias del grupo *Bacillus cereus*, las cuales presentan muy altos niveles (>99 %) de similitud en dicha región genómica (Chang, Shangkuan et al. 2003).

A partir de las 110 muestras de suelo con las que se trabajó, fue posible identificar 114 aislamientos correspondientes a *B. thuringiensis* por la presencia de cristales.

La distribución de *B. thuringiensis* en suelo reportada en trabajos científicos es muy variable. Keshavarzi (2008) encontró 127 aislamientos correspondientes a *B. thuringiensis* a partir de 514 muestras de suelo de diferentes provincias de Irán. A partir de 493 muestras de suelo de diferentes lugares de España peninsular y de las islas Canarias y Baleares, Quesada-Moraga y col. (2004) obtuvieron 3716 aislamientos del género *Bacillus*, pero sólo 273 correspondientes a *B. thuringiensis*. Martin y Travers (1989) analizaron 1.115 muestras de suelo de Nueva Zelanda, Asia, Europa, África, Estados Unidos y América Central y Sur, y la distribución geográfica de los aislamientos correspondientes a *B. thuringiensis* no fue homogénea, sino que osciló entre un 55 % en Nueva Zelanda y un 94 % en Asia. En este trabajo la distribución tampoco fue homogénea; sino que los resultados obtenidos van desde un 45 % en Lavalleja hasta un 95 % en Rocha (Tabla 2).

Otros autores han encontrado que la concentración de *B. thuringiensis* en ciertos tipos de suelos puede ser muy baja, como es el caso de Rampersad y Ammons (2005) que encontraron 79 *B. thuringiensis* a partir de diez mil colonias observadas. En todos los trabajos mencionados, la temperatura de incubación utilizada para los aislamientos fue de 28-30 °C.

5.2 Selección de cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros - Caracterización mediante perfil de genes cry.

Las proteínas con actividad tóxica contra lepidópteros son las de los grupos Cry 1, Cry 2 y Cry 9 (Bravo, Sarabia et al. 1998). Al realizar el análisis de perfil de genes cry mediante PCR, 23 aislamientos dieron positivo en la amplificación del gen cry 1 (27,7 %), y 4 dieron positivo en la amplificación del gen cry 2 (4,8 %), resultando en un total de 26 cepas con toxicidad potencial frente a lepidópteros, dado que una cepa dio positivo para ambos genes (Tablas 2 y 3). En un trabajo realizado a partir de muestras de suelo de Tailandia, se encontró una alta frecuencia de genes cry 1 (81,3 %) y cry 2 (80,6 %) en los aislamientos analizados (Thammasittirong and Attathom 2008). Por otra parte, en muestras de Irán, Seifinejad y col. (2008) obtuvieron un 49 % de genes cry 1, y 56,5 % de genes cry 2; valores muy similares a los obtenidos por Ferrandis y col. (1999) que encontraron un 54 % de genes cry 1, y 42 % de genes cry 2 en aislamientos provenientes de España. En otros estudios se obtuvieron resultados más dispares en la frecuencia de estos dos genes, como es el caso de Salama y col. (2015) que reportaron un 83 % de genes cry 1 y 39 % de genes cry 2 en muestras de Egipto; y en el caso de Mendoza y col. (2012) ocurrió a la inversa, ya que los valores fueron de 36 % para cry 1 y 71 % para cry 2 en aislamientos provenientes de México. En este trabajo no se analizó la presencia del gen cry 9 en los aislamientos, sin embargo las frecuencias halladas por otros autores también varían. Respecto al gen cry 9, Thammasittirong y col. (2008) y Seifinejad y col. (2008) encontraron frecuencias de 37,3 % y 30 %, respectivamente, pero Ben-Dov y col. (1999) y Bravo y col. (1998) obtuvieron valores notoriamente más bajos, correspondientes a 10,2 % y 2,6 %, respectivamente.

En cuanto a la frecuencia de otros genes cry, es decir aquellos que no presentan actividad específica contra lepidópteros, sino contra otros órdenes de insectos, por ejemplo el gen cry 3 (con actividad tóxica contra coleópteros) ha mostrado una frecuencia de 11 %, 17 % y 22 % en los trabajos de Mendoza y col. (2012), Salama y col. (2015) y Bravo y col. (1998) respectivamente; el gen cry 4 (con toxicidad contra dípteros) se ha encontrado con una frecuencia de 14 % y 28 % en los estudios de Salehi y col. (2008) y Salama y col. (2015). En el caso del gen cry 5 (tóxico hacia coleópteros) se observa la diferencia más evidente con un 66 % de aislamientos que lo contienen en el trabajo de Ferrandis y col. (1999) frente a un 0 % según Bravo y col. (1998).

La gran variabilidad encontrada en la distribución de los genes cry entre diferentes trabajos, puede estar reflejando cambios en la frecuencia de aquellos, dependiendo del hábitat y del área geográfica de dónde provienen las muestras, así como también condiciones biológicas y ecológicas; pero también puede estar directamente relacionada con la diversidad de insectos entre una región y otra. Incluso pueden existir relaciones co-evolutivas que favorecen la expresión de distintos patrones de genes cry (Ferrandis, Juárez-Pérez et al. 1999; Salehi Jouzani, Pourjan Abad et al. 2008; Thammasittirong and Attathom 2008).

En este trabajo, de los 114 aislamientos correspondientes a *B. thuringiensis* identificados por observación de cristales al microscopio, se tomó un aislamiento por cada muestra de suelo para la caracterización mediante el perfil de genes cry. Y de un total de 83 aislamientos, 26 dieron positivo en la amplificación de alguno de los dos genes analizados, lo que representa un 31,3 % del total. Una posible explicación es que los demás aislamientos contengan otros genes cry, o genes cyt, y por lo tanto sean potencialmente tóxicos contra otros órdenes de insectos o nemátodos.

También es interesante destacar que ningún trabajo ha encontrado amplificación de los genes de interés en todas las muestras analizadas, Salehi y col. (2008) analizaron 128 aislamientos de *B. thuringiensis* en busca de 10 genes cry y 2 genes cyt, y el 16 % no dio positivo en la amplificación de ninguno de los genes. En el trabajo de Ferrandis y col. (1999) sucedió lo mismo con un 23 % de los aislamientos de *B. thuringiensis*.

Otra hipótesis es que algunos de los aislamientos contengan genes cry nuevos, en ese caso, los aislamientos pueden dar productos de PCR de tamaño diferente al esperado o pueden carecer por completo de productos de PCR (Salama, Abd El-Ghany et al. 2015). En el presente trabajo, algunos aislamientos dieron productos de PCR de tamaño diferente al esperado.

En este trabajo se buscaron sólo genes cry porque la intención a futuro es un producto contra lepidópteros formulado en base a esporas y cristales, sin incluir compuestos solubles en el medio de cultivo, por lo cual proteínas tales como Cyt, Vip y Sip, no fueron consideradas. Tampoco se estudió la presencia de β -exotoxinas ya que por tratarse de una proteína que es secretada al sobrenadante, no es esperable su presencia en mezclas de esporas y cristales, que no contienen restos de medio de cultivo.

5.2.1 Plásmidos que codifican las δ -endotoxinas.

Los genes cry y cyt que codifican las δ -endotoxinas se localizan en plásmidos de alto peso molecular (González and Carlton 1984). También se ha demostrado la localización de un gen vip3 en un plásmido (Mesrati, Tounsi et al. 2005).

Algunos estudios han demostrado que cultivos sucesivos de algunas cepas pueden resultar en una pérdida secuencial de plásmidos y/o en rearrreglos en los mismos. También se ha demostrado que tanto plásmidos grandes como pequeños pueden ser transferidos de una cepa de *B. thuringiensis* a otra (Thomas, Morgan et al. 2000), o incluso a otra especie del grupo *Bacillus cereus* (Thomas, Morgan et al. 2000; Yuan, Hu et al. 2007). Yuan y col. (2007) observaron la transferencia mediante conjugación del plásmido pHT73 que contiene el gen cry 1Ac entre especies del grupo *Bacillus cereus*. De hecho, se cree que las especies que forman el grupo *Bacillus cereus sensu lato*, emergieron a partir de un ancestro común mediante una serie de rearrreglos genéticos mediados entre otras cosas por elementos genéticos móviles (transposones, secuencias de inserción y fagos) junto con otros mecanismos de transferencia horizontal de genes (conjugación, transducción, transformación), lo cual condujo a la adquisición de genes de virulencia. Esto es ejemplificado mediante la observación entre las especies patógenas del grupo (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*), de que los genes

responsables de las diferencias en virulencia y en la especificidad de hospedero, que son las principales características fenotípicas que permiten distinguir estas bacterias, se encuentran en elementos extra-cromosómicos (Van der Auwera, Timmerly et al. 2007).

Las cepas de *B. thuringiensis* usualmente presentan un perfil plasmídico complejo, con hasta 17 plásmidos con tamaños que van de 2 – 250 kb (Sarrafzadeh, Bigey et al. 2007). En un estudio realizado por González y col. (1981) en todas las cepas estudiadas, la pérdida de la producción de cristales, estuvo asociada con la pérdida o modificación de un plásmido específico, el resto del perfil plasmídico se mantuvo. También se observó que a veces la pérdida de un plásmido es acompañada por la aparición de un nuevo plásmido con diferente movilidad electroforética, sugiriendo que rearrreglos tales como deleciones, inserciones y quizás recombinaciones, son relativamente comunes en estos plásmidos.

Un estudio sobre los efectos que pueden tener períodos relativamente cortos de cultivo *in vitro* en el genoma, estructura y fisiología de las bacterias, encontró que una cepa de *B. thuringiensis* propagada en un medio rico, se diferenció de la cepa parental en el perfil plasmídico, en la pérdida completa de la capacidad de producir δ -endotoxinas, la ruptura del gen *vip 3* y la presencia de actividad metabólica alterada. Los autores plantean la hipótesis de que la pérdida de la síntesis de la δ -endotoxina, pudo haber mejorado la eficacia biológica (*fitness*) de la cepa bajo las condiciones en las cuales estaba siendo propagada (Bizzarri, Bishop et al. 2008).

En esta misma línea, Sheppard y col. (2016) observaron que la transferencia vertical de plásmidos no siempre es estable y el grado de inestabilidad puede ser influenciado por factores tales como la diferencia en la eficacia biológica (*fitness*) entre cepas que cargan plásmidos y cepas libres de plásmidos. Estos autores encontraron que el plásmido es inestable en ausencia de un hospedero. Esto sugiere que cargar con el plásmido confiere un mayor costo de energía que influye negativamente en la eficacia biológica (*fitness*) en ausencia de hospedero. Señalan además que la producción de toxinas Cry puede ser muy costosa para la bacteria, ya que los cristales comprenden hasta un 25 % del peso seco del microorganismo lo cual concuerda con la idea de que la pérdida del plásmido que codifica las toxinas, puede resultar en un aumento de la eficacia biológica (*fitness*) en ausencia

de hospedero. Esta idea concuerda con los resultados obtenidos por Sarrafzadeh y col. (2007) quienes compararon una cepa de *B. thuringiensis* libre de plásmido (Cry⁻) con su parental (Cry⁺) y observaron que la cepa Cry⁻ crecía más rápido en condiciones de fermentador que la cepa parental (Cry⁺).

En un estudio de los efectos de la reducción genómica de *B. thuringiensis*, a través de la pérdida gradual de plásmidos, en la expresión de los genes cromosómicos, se observó que las cepas curadas perdieron su capacidad de producir δ -endotoxinas. Además se demostró que la pérdida de ADN extra cromosómico fue en favor de la expresión de los demás genes y en el aumento de la capacidad de las cepas de *B. thuringiensis* de producir enzimas tales como quitinasas y proteasas (Driss, Tounsi et al. 2011).

Estudios realizados en la actividad biocida de *B. thuringiensis var israelensis* han encontrado que la pérdida progresiva de la toxicidad está relacionada con la aparición de variantes sin cristales a una frecuencia relativamente alta (30 % luego de un ciclo de crecimiento). Se observó también que la pérdida irreversible de las δ -endotoxinas está relacionada con la pérdida de un plásmido de alto peso molecular (Kamdar and Jayaraman 1983).

Si bien en este trabajo no se analizó el perfil plasmídico de los aislamientos, puede resultar útil tener en cuenta los antecedentes mencionados referentes a la inestabilidad de los plásmidos que codifican las toxinas, a la hora de intentar comprender los resultados obtenidos. A partir de 110 muestras de suelo, se obtuvieron 114 aislamientos correspondientes a *B. thuringiensis*. Podría plantearse la hipótesis de que algunos aislamientos hayan perdido el plásmido que codifica las toxinas, bajo las condiciones de cultivo del laboratorio en ausencia de hospedero, y que por lo tanto, al observarlos al microscopio no se hayan encontrado los cristales correspondientes. Como se explicó anteriormente, las cepas de *B. thuringiensis* sólo se pueden distinguir de *B. cereus* de forma sencilla y efectiva mediante la presencia de genes cry y/o cyt presentes en los plásmidos, responsables de la producción de las inclusiones parasporales de naturaleza proteica, que son observables al microscopio. De manera que si estos plásmidos se pierden, estas dos bacterias son indistinguibles al microscopio (Baumann, Okamoto et al. 1984; Santana, Moccia-V et al. 2008).

5.3 Selección de la cepa que presente mayor actividad contra *Pseudaletia adultera* mediante ensayos *in vivo*.

5.3.1 Preparación de los inóculos a aplicar a la dieta de *P. adultera*.

Como inóculos para los bioensayos se utilizaron mezclas de esporas y cristales. Una serie de estudios (Johnson, Oppert et al. 1998; Kalmykova, Burtseva et al. 2009) ha demostrado que la presencia de esporas aumenta la actividad tóxica de las proteínas cristales. El uso de cristales purificados implica un mayor riesgo de disminución de la actividad tóxica y deterioro durante el almacenamiento, que cuando se usan mezclas de esporas y cristales (Pérez-Guerrero, Aldebis et al. 2011). En ensayos realizados contra *Colias eurytheme* (Lepidoptera: Pieridae), *T. ni* y *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) utilizando cristales purificados, esporas purificadas y mezclas de ambos, se observó que la mezcla de esporas y cristales fue más efectiva que cualquiera de los dos por separado (Somerville, Tanada et al. 1970). En base a estos reportes es que en este trabajo se decidió utilizar mezclas de esporas y cristales, aunque la estandarización de los inóculos se realizó en base a la concentración de cristales. Sería interesante para futuros trabajos, cuantificar las esporas y analizar si poseen algún efecto en la actividad tóxica de los aislamientos.

La preparación de los inóculos, también llevó un tiempo de puesta a punto de la técnica. En los primeros cuatro ensayos, se realizó una determinación del contenido de proteínas de los inóculos, mediante la técnica de Bradford, según Pérez-Guerrero y col. (2012). Pero dada la variabilidad en la concentración de proteínas de los diferentes inóculos, a partir del quinto ensayo se decidió estandarizar los inóculos en 1×10^6 cristales/ μL mediante recuento microscópico directo, ya que dicha estandarización nos permite comparar los resultados obtenidos a partir de las diferentes cepas evaluadas.

5.3.2 Bioensayos contra larvas de *Pseudaletia adultera*.

Los bioensayos se realizaron contra larvas de *P. adultera* en 3° estadio alimentadas con dieta artificial tratada superficialmente con los distintos inóculos. Las larvas de

algunas especies como por ejemplo *H. virescens* se alimentan de la superficie de la dieta, mientras que otras lo hacen perforando la dieta como por ejemplo *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) que permanece poco tiempo en la superficie del agar lo que le da bajas probabilidades de estar expuesta a la toxina, si ésta fue aplicada superficialmente. En estos casos, la incorporación del inóculo a la dieta durante la preparación de la misma, sería lo más apropiado. Por lo tanto, es esencial para el diseño de los ensayos, conocer la forma de alimentación del insecto que se está estudiando (O'Callaghan, Glare et al. 2012). Las larvas de *P. adultera* tienen hábitos alimenticios del tipo masticador (Bentancourt and Scatoni 1999), por eso se utilizó la técnica de inoculación superficial de la dieta.

En algunas especies de insectos, los estadios larvarios más jóvenes son más sensibles a la acción de *B. thuringiensis* en comparación con estadios más avanzados bajo las mismas condiciones. Steinkraus y col. (1999) realizaron un estudio con larvas de 1° y 3° estadio de *P. unipuncta* y observaron que las larvas del 3° estadio fueron entre 3-6 veces menos susceptibles que las de 1° estadio al tratamiento con *B. thuringiensis*. Una característica importante a tener en cuenta es que las larvas más jóvenes son frágiles y requieren mayor cuidado en la manipulación (Peacock, Schweitzer et al. 1998; Steinkraus and Young 1999; O'Callaghan, Glare et al. 2012). Pilcher y col. (1997) realizaron dos trabajos de campo en dos años consecutivos con larvas de *P. unipuncta* en 1° estadio, y señalaron que en el segundo año debieron usar diferentes técnicas de laboratorio porque en el primer año observaron altos niveles de mortalidad por excesiva manipulación de las larvas.

5.3.3 Análisis de mortalidad.

A partir del análisis por test de Chi-cuadrado y MLG se concluyó que las cepas M4A, Tt 25, S2A y S3A (Tablas 6 y 7) presentaron diferencias significativas en la mortalidad respecto al control negativo, lo cual indica que estos aislamientos tienen un efecto tóxico contra larvas de *P. adultera*. Como se señaló anteriormente, no se observaron diferencias en la mortalidad provocada por los aislamientos Tt 25 y Tt 25+, que corresponden a la misma cepa evaluada a dos concentraciones diferentes, 1×10^6 y $2,42 \times 10^6$ cristales/ μL respectivamente. De todas formas sería interesante, poder continuar el estudio de la actividad de todos los aislamientos a

diferentes concentraciones para poder determinar no sólo a qué valor de concentración de cristales presentan su actividad máxima, sino también las dosis efectivas (ej. LD50).

Respecto a los resultados del análisis de mortalidad en función del tiempo, mediante curvas de sobrevivencia, se observaron diferencias significativas entre los controles positivos utilizados en los diferentes ensayos. Estas diferencias podrían deberse a variables medioambientales o del pool genético de larvas utilizadas en los ensayos, que afectan el proceso de cuán rápido las toxinas de *B. thuringiensis* provocan la muerte de la larva del insecto.

En el caso de los controles negativos no se observaron diferencias significativas al comparar las curvas de sobrevivencia. Y en el análisis del efecto de los aislamientos, mediante este método, las cepas M4A, Tt 25+, S2A y S3A mostraron diferencias significativas respecto al control negativo (Tabla 11; Figuras 13, 14 y 15), de lo cual puede inferirse que no sólo se destaca su efecto tóxico en tanto logran niveles de mortalidad significativos, sino también en cuán rápido alcanzan dichos resultados. En este caso, observamos diferentes resultados entre Tt 25 y Tt 25+, dos concentraciones diferentes de la misma cepa, cuyo valor más alto podría influir en la velocidad a la cual logra el efecto larvicida.

De las 26 cepas con amplificación positiva de genes cry potencialmente tóxicos contra lepidópteros, sólo cuatro (M4A, Tt 25, S2A y S3A) presentaron resultados estadísticamente significativos en cuanto a mortalidad. Una posible hipótesis respecto de este resultado podría ser que algunos aislamientos que contienen los genes cry de interés, no los posean en su forma activa. La técnica de PCR permite determinar la presencia de genes cry, pero no permite determinar si los mismos se están expresando o se encuentran silenciados (Baig and Mehnaz 2010). En un estudio realizado por Seifinejad y col. (2008) cepas que contienen el mismo perfil de genes cry ensayadas contra *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) mostraron diferente actividad tóxica. Este resultado confirma que la presencia de genes específicos no es un indicador exacto de toxicidad, ya que según estos autores, los genes podrían estar inactivos, bajo el control de un promotor débil o siendo expresados a una concentración muy baja como para ejercer efecto tóxico.

Dado que los primers utilizados en este trabajo no permiten distinguir entre subgrupos de genes cry 1, la presencia de diferentes subtipos de genes cry 1 en los aislamientos podría explicar las diferencias de toxicidad observadas. Un ejemplo de esto, es el trabajo de Bravo y col. (1998) en el cual los aislamientos que contienen los genes cry 1C y cry 1D fueron más eficaces en los bioensayos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *S. exigua* que los aislamientos que contienen los otros tipos de genes cry 1 (por ejemplo cry 1Aa, cry 1Ab, cry 1Ac, cry 1Ba, cry 1Bb, entre otros). Lo mismo se observó en el trabajo de Patel y col. (2012) en el cual evaluaron aislamientos de *B. thuringiensis* que contenían el gen cry 1 contra *H. armigera*, y algunos aislamientos resultaron tóxicos y otros no. Los autores también consideran la hipótesis de que los aislamientos pueden contener distintos subtipos de genes cry 1.

Otro aspecto a tener en consideración, es la disminución de la actividad tóxica a causa de la pérdida de los plásmidos que codifican las toxinas, Algunos trabajos presentan evidencias que confirman esta hipótesis (González, Dulmage et al. 1981; Bizzarri, Bishop et al. 2008). En particular el trabajo de Sheppard y col. (2016) aporta un rasgo muy interesante, dado que todos los aislamientos con pérdida de plásmido sufrieron una fuerte disminución de la mortalidad en los bioensayos, sin embargo, observaron que el plásmido no se perdió completamente en la población de bacterias, lo que sugiere que debe haber algún mecanismo que asegure el mantenimiento del plásmido en ausencia de hospedero. Además observaron una importante correlación entre el número de copias del plásmido en la población y la mortalidad del hospedero, lo cual implica que la variación en el número de copias del plásmido a nivel poblacional, conduce a niveles variables de virulencia.

5.3.4 Análisis de efectos sub-letales.

Los efectos sub-letales se definen como efectos fisiológicos y/o etológicos en individuos que sobreviven a la exposición a concentraciones o dosis bajas o sub-letales de un compuesto tóxico que no causa mortalidad (Desneux, Decourtye et al. 2007). En particular en ensayos de toxicidad contra insectos, los efectos sub-letales son aquellos que no provocan valores significativamente diferentes de mortalidad en las larvas, pero inducen diversos efectos en su desarrollo.

Un estudio realizado en *C. lacinia*, un lepidóptero no diana, abundante en los cultivos de algodón de América Central y Sur, demostró que la toxina Cry 1Ac consumida en dosis sub-letales es transferida a los huevos de la siguiente generación, provocando una disminución en la supervivencia y un aumento en el tiempo de desarrollo de las larvas F1 (Paula, Andow et al. 2014). Este resultado demuestra que la forma activa de la toxina Cry 1Ac puede ser transferida de manera intraespecífica; y además que las toxinas de *B. thuringiensis* son capaces de afectar insectos no diana.

En este trabajo se evaluó el efecto sub-letal de *B. thuringiensis* en base al éxito de las larvas de *P. adultera* en alcanzar el estado adulto.

Se evaluó la tasa de emergencia de adultos de los aislamientos correspondientes a los ensayos en los cuales el control negativo presentó un valor de emergencia de adultos mayor al 50 %.

Al comparar la tasa de emergencia de adultos en los aislamientos mediante test de Chi-cuadrado y MLG, las cepas M8 y Tt 23 presentaron diferencias significativas con el control negativo (Tablas 13 y 14). De esta manera, si bien estos aislamientos no alcanzaron valores de mortalidad significativamente diferentes a los de su control correspondiente, podrían afectar el desarrollo de las larvas impidiendo que alcancen el estado adulto, dada la disminución en la emergencia de adultos, a través de un efecto sub-letal de las toxinas que expresan.

Se han realizado estudios del efecto sub-letal de cepas de *B. thuringiensis* sobre diferentes especies de insectos, por ejemplo *S. exigua*; *H. armigera* y *S. littoralis*, y han reportado efectos en la capacidad reproductiva del insecto, tales como: retardo en el tiempo para completar el ciclo de vida, disminución en la emergencia de adultos, reducción de la fecundidad, disminución del número de huevos depositados y prolongación del tiempo generacional (Salama, Foda et al. 1981; Zhang, Ma et al. 2013). Dulmage y Martínez (1973) reportaron que en larvas de *H. virescens* se produjo un marcado enlentecimiento del desarrollo, muchas larvas no lograron pasar a la fase de pupa, mientras que otras que sí puparon no fueron capaces de emerger como adultos. Este último efecto es el que se observó en este

trabajo, los individuos que no lograron completar el ciclo de vida, pasaron a la fase de pupa pero no emergieron como adultos.

Por lo tanto, no se puede llegar a la conclusión de que una cepa de *B. thuringiensis* no es activa contra una determinada especie basándose únicamente en bajos valores de mortalidad en la fase de larva. Niveles sub-letales de las toxinas o una reducción en el tiempo de exposición a las mismas, si bien no son causa directa de mortalidad en las larvas, provocan una serie de efectos biológicos que reducen indirectamente la potencia del insecto plaga y el daño que éste provoca en la planta (Salama, Foda et al. 1981; Peacock, Schweitzer et al. 1998). La medida de la toxicidad de un aislamiento basada únicamente en la estimación de la dosis letal del mismo, sería sólo una medida parcial de sus verdaderos efectos nocivos. Además no todos los insectos son expuestos a la dosis letal en condiciones de campo, debido a variaciones en la susceptibilidad entre individuos, la eficiencia de la aplicación del bioinsecticida y la interacción del bioinsecticida con el ambiente (Gulzar and Wright 2015).

6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones.

Con los métodos de aislamiento e identificación optimizados fue posible obtener aislamientos correspondientes a *B. thuringiensis* en muestras de suelo del territorio uruguayo.

Mediante la técnica de PCR utilizada se obtuvo una baja frecuencia de genes cry 1 y cry 2 en los aislamientos nativos encontrados. El porcentaje de cepas portadoras de dichos genes fue bajo comparado con valores obtenidos en otras regiones geográficas.

Mediante los ensayos *in vivo* contra *P. adultera*, se observó que sólo unos pocos aislamientos nativos de *B. thuringiensis* poseen actividad insecticida ya sea provocando la mortalidad de las larvas o a través de un efecto sub-letal.

6.2 Perspectivas.

Sería de interés continuar la caracterización de los aislamientos, mediante la búsqueda de la presencia de los genes cry 9 y vip 3 que son potencialmente tóxicos contra lepidópteros, así como también realizar reacciones de PCR con primers específicos para identificar subtipos de los genes cry de interés.

Una vez identificados y caracterizados los aislamientos, es necesario almacenarlos mediante congelación o liofilización, dada la inestabilidad de los plásmidos que contienen los genes responsables de la toxicidad.

En este trabajo se evaluó la toxicidad de los aislamientos mediante bioensayos, utilizando mezclas de esporas y cristales como inóculos, estandarizados únicamente según el número de cristales. Es importante, volver a examinar el rol de las esporas en la actividad tóxica de *B. thuringiensis*. Existe una apreciación general de que los cristales son los únicos responsables de la efectividad tóxica tanto de inóculos como de preparaciones comerciales, y el rol de las esporas ha quedado relegado (Somerville, Tanada et al. 1970). Sería de interés para trabajos futuros, medir la concentración de esporas presente en los inóculos, de manera de poder evaluar si afectan la toxicidad de los aislamientos, tanto en los valores de mortalidad como de efectos sub-letales. Johnson y col. (1998) realizaron el conteo

de esporas mediante dos métodos, un recuento microscópico y también mediante shock térmico y subsiguiente germinación de las esporas en medio de cultivo. Estos autores evaluaron la actividad tóxica de cristales y esporas purificados, por separado y mezclas de ellos.

Además, sería interesante realizar bioensayos evaluando diferentes concentraciones de cristales para determinar las curvas dosis-respuesta de los aislamientos.

Podría continuarse el estudio de la toxicidad de los aislamientos, mediante la realización de bioensayos contra larvas más jóvenes de *P. adultera*, para determinar si se cumple la hipótesis de que los estadios más avanzados son menos susceptibles que los estadios más tempranos, bajo las mismas condiciones, como concluyeron Steinkraus y col. (1999) en sus estudios con la especie relacionada *P. unipuncta*.

Finalmente, en la medida en que se avance en la caracterización y análisis de toxicidad de los aislamientos, también sería relevante analizarlos respecto a la presencia de genes *cyt* y de proteínas solubles tales como *Vip*, *Sip* y β -exotoxinas. En particular, es importante descartar la producción de β -exotoxinas en los aislamientos seleccionados por actividad insecticida, si el objetivo es utilizarlos como control biológico, antes de pasar a la etapa de crecimiento en fermentador.

7. Bibliografía

- Aktar, W., D. Sengupta, et al. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdisciplinary Toxicology. **2**: 1.
- Amichot, M., C. Curty, et al. (2015). "Side effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on the hymenopterous parasitic wasp *Trichogramma chilonis*." Environmental Science and Pollution Research: 1-7.
- Ammons, D., J. Rampersad, et al. (2002). "Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*." Journal of Invertebrate Pathology **79**(3): 203-204.
- Ammounh, H., M. Harba, et al. (2011). "Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests." Turkish Journal of Agriculture and Forestry **35**(4): 421-431.
- Argôlo-Filho, R. and L. Loguercio (2014). "*Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches." Insects **5**(1): 62.
- Baig, D. N. and S. Mehnaz (2010). "Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks." Microbiological Research **165**(5): 376-383.
- Baró Robaina, Y., D. M. Fontana Capalbo, et al. (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**: 187-192.
- Baumann, L., K. Okamoto, et al. (1984). "Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*." Journal of Invertebrate Pathology **44**(3): 329-341.
- Bavykin, S. G., Y. P. Lysov, et al. (2004). "Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms." Journal of Clinical Microbiology **42**(8): 3711-3730.
- Bazinet, A. L. (2017). "Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*." BMC Evolutionary Biology **17**(1).
- Ben-Dov, E. (2014). "*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins." Toxins **6**(4): 1222.

- Ben-Dov, E., Q. Wang, et al. (1999). "Multiplex PCR screening to detect cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* strains." Applied and Environmental Microbiology **65**(8): 3714-3716.
- Ben-Dov, E., A. Zaritsky, et al. (1997). "Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*." Applied and Environmental Microbiology **63**(12): 4883-4890.
- Bentancourt, C. M. and I. B. Scatoni (1999). Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay, Universidad de la República del Uruguay, Facultad de Agronomía.
- Berry, C., S. O'Neil, et al. (2002). "Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Applied and Environmental Microbiology **68**(10): 5082-5095.
- Bizzarri, M. F., A. H. Bishop, et al. (2008). "Changes in the properties of *Bacillus thuringiensis* after prolonged culture in a rich medium." Journal of Applied Microbiology **104**(1): 60-69.
- Blibech, I., M. Ksantini, et al. (2012). "Isolation of entomopathogenic *Bacillus* from a biodynamic olive farm and their pathogenicity to lepidopteran and coleopteran insect pests." Crop Protection **31**(1): 72-77.
- Bobrowski, V. L., G. Pasquali, et al. (2001). "Detection of cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from South of Brazil and activity against *Aanticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae)." Brazilian Journal of Microbiology **32**: 105-109.
- Bozlagan, I., A. Ayvaz, et al. (2010). "Detection of the cry1 gene in *Bacillus thuringiensis* isolates from agricultural fields and their bioactivity against two stored product moth larvae." Turkish Journal of Agriculture and Forestry **34**: 145-154.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1): 248-254.
- Bravo, A., S. Sarabia, et al. (1998). "Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection." Applied and Environmental Microbiology **64**(12): 4965-4972.

- Cespedes, C. L., J. Alarcon, et al. (2015). "New environmentally-friendly antimicrobials and biocides from Andean and Mexican biodiversity." Environmental Research **142**: 549-562.
- Contreras, E., M. Benito-Jardón, et al. (2015). "*Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity." Developmental & Comparative Immunology **50**(2): 139-145.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R. (2016). ""*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature"." from <http://www.btnomenclature.info/>.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, et al. (1998). "Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(3): 807-813.
- Chang, Y.-H., Y.-H. Shangkuan, et al. (2003). "PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells." Applied and Environmental Microbiology **69**(8): 4502-4510.
- Damalas, C. A. (2016). Safe Food Production with Minimum and Judicious Use of Pesticides. Food Safety: Basic Concepts, Recent Issues, and Future Challenges. J. Selamat and S. Z. Iqbal. Cham, Springer International Publishing: 43-55.
- Deist, B., M. Rausch, et al. (2014). "Bt Toxin Modification for Enhanced Efficacy." Toxins **6**(10): 3005.
- Desneux, N., A. Decourtye, et al. (2007). "The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods." Annual Review of Entomology **52**(1): 81-106.
- Despa, S. "What is Survival Analysis?" Cornell Statistical Consulting Unit, 1-3.
- Donovan, W. P., J. T. Engleman, et al. (2006). "Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae." Applied Microbiology and Biotechnology **72**(4): 713-719.
- Dos Santos, H. M. P., V. W. Teixeira, et al. (2013). "Histopathology of organs from neonate offspring born to female rats exposed to sublethal doses of

- biological and synthetic insecticides." International Journal of Morphology **31**(1): 246-253.
- Driss, F., S. Tounsi, et al. (2011). "Relationship between plasmid loss and gene expression in *Bacillus thuringiensis*." Current Microbiology **62**(4): 1287-1293.
- Dubois, N. R. and D. H. Dean (1995). "Synergism between CryIA insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Larvae." Environmental Entomology **24**(6): 1741-1747.
- Dulmage, H. T. and E. Martinez (1973). "The effects of continuous exposure to low concentrations of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*." Journal of Invertebrate Pathology **22**(1): 14-22.
- Elsayed, E. A., N. Z. Othman, et al. (2014). "Bioprocess development for high cell mass and endospore production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in semi-industrial scale." Journal of Pure and Applied Microbiology **8**(4): 2773-2783.
- Elleuch, J., R. Z. Zghal, et al. (2014). "New *Bacillus thuringiensis* toxin combinations for biological control of lepidopteran larvae." International Journal of Biological Macromolecules **65**: 148-154.
- Elleuch, J., R. Zribi Zghal, et al. (2015). "Evidence of two mechanisms involved in *Bacillus thuringiensis israelensis* decreased toxicity against mosquito larvae: Genome dynamic and toxins stability." Microbiological Research **176**: 48-54.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, et al. (1996). "Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(11): 5389-5394.
- Federici, B. A. (1999). *Bacillus thuringiensis* in Biological Control.
- Ferrandis, M. D., V. M. Júdez-Pérez, et al. (1999). "Distribution of cryI, cryII and cryV genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain." Systematic and Applied Microbiology **22**(2): 179-185.

- Fiuza, L. M., R. Schünemann, et al. (2012). "Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)." Brazilian Journal of Biology **72**(2): 363-369.
- Fritze, D. (2004). "Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria." Phytopathology **94**(11): 1245-1248.
- Fursan, M. (2012). Use and efficacy of Bt compared to less environmentally safe alternatives. Bacillus thuringiensis biotechnology. D. E. Sansinenea. London New York, Springer Dordrecht Heidelberg 87-92.
- George, Z. and N. Crickmore (2012). *Bacillus thuringiensis* Applications in Agriculture. Bacillus thuringiensis biotechnology. E. Sansinenea, Springer, Dordrecht: 19-39.
- Gómez, I., B. Flores, et al. (2015). "*Bacillus thuringiensis* Cry1AbMod toxin counters tolerance associated with low cadherin expression but not that associated with low alkaline phosphatase expression in *Manduca sexta*." Peptides **68**: 130-133.
- González, J. and B. C. Carlton (1984). "A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*." Plasmid **11**(1): 28-38.
- González, J., H. T. Dulmage, et al. (1981). "Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*." Plasmid **5**(3): 351-365.
- Grove, M., W. Kimble, et al. (2001). "Effects of individual *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins on adult *Heliothis virescens* (F.) and *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae)." BioControl **46**(3): 321-335.
- Guan, P., X. Dai, et al. (2014). "*Bacillus thuringiensis* subsp. *sichuansis* strain MC28 produces a novel crystal protein with activity against *Culex quinquefasciatus* larvae." World Journal of Microbiology and Biotechnology **30**(4): 1417-1421.
- Gulzar, A. and D. J. Wright (2015). "Sub-lethal effects of Vip3A toxin on survival, development and fecundity of *Heliothis virescens* and *Plutella xylostella*." Ecotoxicology **24**(9): 1815-1822.
- Guo, Z., S. Kang, et al. (2015). "Down-regulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth,

- Plutella xylostella* (L.)." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **59**: 30-40.
- Hasenbein, S., J. Peralta, et al. (2017). "Environmentally relevant concentrations of herbicides impact non-target species at multiple sublethal endpoints." *Science of The Total Environment* **607-608**: 733-743.
- Henderson, D. A., J. T. V. Inglesby, et al. (2002). "Management of Anthrax." *Clinical Infectious Diseases* **35**(7): 851-858.
- Hercos Velicente, F. and U. Gomes De Paula Lana (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.
- Inc., M. (2016). "Select the statistics for Descriptive Statistics (Statistics tab)." from www.minitab.com.
- Johnson, D. E., B. Oppert, et al. (1998). "Spore Coat Protein Synergizes *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxicity for the Indianmeal Moth (*Plodia interpunctella*)." *Current Microbiology* **36**(5): 278-282.
- Juárez-Pérez, V. M., M. D. Ferrandis, et al. (1997). "PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 2997-3002.
- Kalmykova, G., L. Burtseva, et al. (2009). "Activity of spores and extracellular proteins from six Cry⁺ strains and a Cry⁻ strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against the western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae)." *Canadian Journal of Microbiology* **55**(5): 536-543.
- Kamdar, H. and K. Jayaraman (1983). "Spontaneous loss of a high molecular weight plasmid and the biocide of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **110**(2): 477-482.
- Karuppuchamy, P. and S. Venugopal (2016). Chapter 21 - Integrated Pest Management. *Ecofriendly Pest Management for Food Security*. San Diego, Academic Press: 651-684.
- Keshavarzi, M. (2008). "Isolation, identification and differentiation of local *B. thuringiensis* strains." *Journal of Agricultural Science and Technology* **10**(SUPPL.): 493-499.

- Khan, M. A., B. Paul, et al. (2016). Potential of *Bacillus thuringiensis* in the Management of Pernicious Lepidopteran Pests. Plant, Soil and Microbes: Volume 2: Mechanisms and Molecular Interactions. K. R. Hakeem and M. S. Akhtar. Cham, Springer International Publishing: 277-301.
- Lajmanovich, R. C., C. M. Junges, et al. (2015). "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles." Environmental Research **136**: 205-212.
- Lemes, A. R. N., C. C. Davolos, et al. (2014). "Synergism and Antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 Proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*." PLoS ONE **9**(10): e107196.
- Leppla, S. H. (2006). CHAPTER 18 - *Bacillus anthracis* toxins. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Third Edition). London, Academic Press: 323-347.
- Li, H. and G. Bouwer (2014). "Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)." Journal of Invertebrate Pathology **121**: 7-13.
- Liao, J. Y., Y. Q. Gao, et al. (2015). "Purification of the insecticidal Cry2Ad protein from a Bt-isolated BRC-HZP10 strain and toxin assay to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)." **14**: 7661-7670.
- Lima, D. B., J. W. S. Melo, et al. (2015). "Bioinsecticide-Predator Interactions: Azadirachtin Behavioral and Reproductive Impairment of the Coconut Mite Predator *Neoseiulus baraki*." PLoS ONE **10**(2): e0118343.
- Liu, X., M. Chen, et al. (2014). "Natural Enemies Delay Insect Resistance to Bt Crops." PLoS ONE **9**(3): e90366.
- Liu, X., L. Ruan, et al. (2014). "Thuringiensin: A Thermostable Secondary Metabolite from *Bacillus thuringiensis* with Insecticidal Activity against a Wide Range of Insects." Toxins **6**(8): 2229.
- Liu, Y., Q. Lai, et al. (2015). "Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group." Scientific Reports **5**: 14082.
- Logan, N. A. and P. De Vos (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- Malo, J., J. Nicolás, et al. (2018). Desarrollo de un bioinsecticida basado en un nuevo aislado de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

- Mansour, S. A. (2004). "Pesticide exposure—Egyptian scene." Toxicology **198**(1-3): 91-115.
- Martin, P. A. W. and R. S. Travers (1989). "Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates." Applied and Environmental Microbiology **55**(10): 2437-2442.
- Masri, L., A. Branca, et al. (2015). "Host-Pathogen Coevolution: The selective advantage of *Bacillus thuringiensis* virulence and its Cry toxin genes." PLoS Biol **13**(6): e1002169.
- Maughan, H. and G. Van der Auwera (2011). "Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading." Infection, Genetics and Evolution **11**(5): 789-797.
- McDonald, B. A. and E. H. Stukenbrock (2016). "Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **371**(1709).
- Mendoza, G., A. Portillo, et al. (2012). "New combinations of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico." International Microbiology **15**(4): 211-218.
- Mesrati, L. A., S. Tounsi, et al. (2005). "Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid." FEMS Microbiology Letters **244**(2): 353-358.
- Miller, R. A., S. M. Beno, et al. (2016). "*Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **66**(11): 4744-4753.
- Mnif, I. and D. Ghribi (2015). "Potential of bacterial derived biopesticides in pest management." Crop Protection **77**: 52-64.
- Monnerat, R. G., A. C. Batista, et al. (2007). "Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*." Biological Control **41**(3): 291-295.
- Nicholson, G. M. (2007). "Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control." Toxicon **49**(4): 413-422.

- O'Callaghan, M., T. R. Glare, et al. (2012). Chapter IV - Bioassay of bacterial entomopathogens against insect larvae. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition). L. A. Lacey. San Diego, Academic Press: 101-127.
- Obata, F., S. Tanaka, et al. (2015). "Induction of rapid and selective cell necrosis in *Drosophila* using *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and its silkworm receptor." BMC Biology **13**(1): 1-10.
- Öztürk, F., L. Açık, et al. (2009). "Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from soil and testing the bioactivity of isolates against *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvae." Turkish Journal of Biochemistry **4**: 202-208.
- Palma, L. and C. Berry (2016). "Understanding the structure and function of *Bacillus thuringiensis* toxins." Toxicon **109**: 1-3.
- Palma, L., D. Muñoz, et al. (2014). "*Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity." Toxins **6**(12): 3296.
- Park, S. H., H. J. Kim, et al. (2007). "Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR." Journal of Microbiology and Biotechnology **17**(7): 1177-1182.
- Park, Y., R. M. González-Martínez, et al. (2014). "ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis." BMC Biology **12**(1): 1-15.
- Pascual Aguilar, J. A., V. Andreu, et al. (2017). "Pesticide occurrence in the waters of Júcar River, Spain from different farming landscapes." Science of The Total Environment **607-608**: 752-760.
- Patel, K. D., F. C. Bhanshali, et al. (2013). "A new enrichment method for isolation of *Bacillus thuringiensis* from diverse sample types." Applied Biochemistry and Biotechnology **170**(1): 58-66.
- Patel, K. D., C. J. Chudasama, et al. (2012). "Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from diverse habitats of India." Journal of Basic Microbiology **52**(4): 437-445.
- Paula, D. P., D. A. Andow, et al. (2014). "Uptake and Transfer of a *Bt* Toxin by a Lepidoptera to Its Eggs and Effects on Its Offspring." PLoS ONE **9**(4): e95422.

- Peacock, J. W., D. F. Schweitzer, et al. (1998). "Laboratory assessment of the effects of *Bacillus thuringiensis* on native lepidoptera." Environmental Entomology **27**(2): 450-457.
- Pérez-Guerrero, S., H. K. Aldebis, et al. (2011). "Toxicity of several δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against the cotton pest *Earias insulana* (Lepidoptera: Noctuidae)." Crop Protection **30**(8): 1024-1027.
- Pérez-Guerrero, S., H. K. Aldebis, et al. (2012). "Toxicity of six *Bacillus thuringiensis* cry proteins against the olive moth prays Oleae." Bulletin of Insectology **65**(1): 119-122.
- Pilcher, C. D., M. E. Rice, et al. (1997). "Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidoptera: Noctuidae)." Journal of Economic Entomology **90**(2): 669-678.
- Porcar, M., A. Délecluse, et al. (2014). "Early transcription of *Bacillus thuringiensis* cry genes in strains active on Lepidopteran species and the role of gene content on their expression." Antonie van Leeuwenhoek **105**(6): 1007-1015.
- Portugal, L., J. L. Gringorten, et al. (2014). "Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1." Peptides **53**: 292-299.
- Qiu, L., L. Hou, et al. (2015). "Cadherin is involved in the action of *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Aa in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*." Journal of Invertebrate Pathology **127**: 47-53.
- Quesada-Moraga, E., E. García-Tóvar, et al. (2004). "Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain." Microbiological Research **159**(1): 59-71.
- Rampersad, J. and D. Ammons (2005). "A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results." BMC Microbiology **5**.
- Rehermann, G., P. Altesor, et al. (2016). "Conspecific females promote calling behavior in the noctuid moth, *Pseudaletia adultera*." Entomologia Experimentalis et Applicata **159**(3): 362-369.

- Reyes-Ramírez, A. and J. E. Ibarra (2008). "Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains." Applied and Environmental Microbiology **74**(1): 125-129.
- Ruiu, L. (2015). "Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management." Insects **6**(2): 352.
- Salama, H. S., N. M. Abd El-Ghany, et al. (2015). "Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization." Journal of Genetic Engineering and Biotechnology **13**(2): 101-109.
- Salama, H. S., M. S. Foda, et al. (1981). "Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxins of *Bacillus thuringiensis* for different periods." Journal of Invertebrate Pathology **38**(2): 220-229.
- Salehi Jouzani, G., A. Pourjan Abad, et al. (2008). "Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(2): 83-94.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular cloning a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.
- Sanchis, V. (2012). Genetic Improvement of Bt Strains and Development of Novel Biopesticides. Bacillus thuringiensis Biotechnology. E. Sansinenea, Springer Netherlands: 215-228.
- Sansinenea, E. (2012). Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*. Bacillus thuringiensis Biotechnology. D. E. Sansinenea, Springer Science+Business Media: 3-18.
- Santana, M. A., C. C. Moccia-V, et al. (2008). "*Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples." Journal of Microbiological Methods **75**(2): 357-358.
- Sarrafzadeh, M. H., F. Bigey, et al. (2007). "Simple indicators of plasmid loss during fermentation of *Bacillus thuringiensis*." Enzyme and Microbial Technology **40**(5): 1052-1058.
- Sauka, D. H., R. E. Basurto-Ríos, et al. (2010). "Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain." Neotropical Entomology **39**(5): 767-773.

- Sauka, D. H. and G. B. Benintende (2008). "*Bacillus thuringiensis*: General aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pests." Revista Argentina de Microbiología **40**(2): 124-140.
- Sauka, D. H., S. E. Rodriguez, et al. (2012). "New variants of lepidopterical toxin genes encoding *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa proteins." Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **22**(6): 373-380.
- Sawaya, M. R., D. Cascio, et al. (2014). "Protein crystal structure obtained at 2.9 Å resolution from injecting bacterial cells into an X-ray free-electron laser beam." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(35): 12769-12774.
- Seifinejad, A., G. R. S. Jouzani, et al. (2008). "Characterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection." Biological Control **44**(2): 216-226.
- Sheppard, A. E., R. Nakad, et al. (2016). "High instability of a nematocidal Cry toxin plasmid in *Bacillus thuringiensis*." Journal of Invertebrate Pathology **133**: 34-40.
- Shishir, M. A., M. M. Hoq, et al. (2014). "Abundance and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Bangladesh and their cry genes profile." Frontiers in Environmental Science **2**.
- Shu, C., H. Su, et al. (2013). "Characterization of cry9Da4, cry9Eb2, and cry9Ee1 genes from *Bacillus thuringiensis* strain T03B001." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(22): 9705-9713.
- Singh, A., K. S. Boora, et al. (2007). "Effect of different additives on the persistence and insecticidal activity of native strains of *Bacillus thuringiensis*." Indian Journal of Microbiology **47**(1): 42-45.
- Somerville, H. J., Y. Tanada, et al. (1970). "Lethal effect of purified spore and crystalline endotoxin preparations of *Bacillus thuringiensis* on several lepidopterous insects." Journal of Invertebrate Pathology **16**(2): 241-248.
- Steinkraus, D. C. and S. Y. Young (1999). "*Bacillus thuringiensis* for use against armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae), on wheat." Florida Entomologist **82**(2): 209-218.

- Tamez Guerra, P., L. J. Galán Wong, et al. (2001). "Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México." Ciencia UANL IV: 143-152.
- Tanada, Y. and H. K. Kaya (2012). Insect pathology, Elsevier Science.
- Thammasittirong, A. and T. Attathom (2008). "PCR-based method for the detection of cry genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand." Journal of Invertebrate Pathology **98**(2): 121-126.
- Thomas, D. J. I., J. A. W. Morgan, et al. (2000). "Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae." Applied and Environmental Microbiology **66**(1): 118-124.
- Travers, R. S., P. A. W. Martin, et al. (1987). "Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp." Applied and Environmental Microbiology **53**(6): 1263-1266.
- Van der Auwera, G. A., S. Timmerly, et al. (2007). "Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs." International Journal of Food Microbiology **113**(2): 164-172.
- Xu, C., U. Chinte, et al. (2015). "Crystal structure of Cry51Aa1: A potential novel insecticidal aerolysin-type β -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis*." Biochemical and Biophysical Research Communications **462**(3): 184-189.
- Xu, C., B.-C. Wang, et al. (2014). "Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins." Toxins **6**(9): 2732.
- Yazgan, M. S. and A. Tanik (2005). "A new approach for calculating the relative risk level of pesticides." Environment International **31**(5): 687-692.
- Yuan, Y. M., X. M. Hu, et al. (2007). "Kinetics of plasmid transfer among *Bacillus cereus* group strains within lepidopteran larvae." Archives of Microbiology **187**(6): 425.
- Zghal, R. Z. and S. Jaoua (2006). "Evidence of DNA rearrangements in the 128-kilobase pBtoxis plasmid of *Bacillus thuringiensis israelensis*." Molecular Biotechnology **33**(3): 191-198.
- Zhang, Y., Y. Ma, et al. (2013). "*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins affect lifespan and reproductive performance of *Helicoverpa armigera* and

Spodoptera exigua adults." Journal of Economic Entomology **106**(2): 614-621.

Zhu, X., Y. Lei, et al. (2015). "Construction and characterisation of near-isogenic *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) strains resistant to Cry1Ac toxin." Pest Management Science **71**(2): 225-233.

8. Anexo

8.1 Protocolo de preparación del inóculo a base de cristales y esporas de *B. thuringiensis* a aplicar a la dieta en los bioensayos contra *P. adultera*.

- Preparar matraces⁴ de 250 mL con 50 mL de caldo T3 y tubos (uno por cepa) de suero fisiológico. Esterilizar en autoclave.
- Sembrar en placa de medio T3 las cepas de la colección a utilizar en el bioensayo, incluido el control positivo, e incubar a 28 °C, 24 h.
- Realizar un frotis teñido con azul de Coomasie a partir de una colonia aislada de cada cepa y observar al microscopio óptico por inmersión, para verificar presencia de cristales y esporas, y ausencia de contaminación en el cultivo.
- Realizar una suspensión McFarland 1 en suero fisiológico estéril de cada cepa que presente espora y cristales, e inocular con 1 mL de dicha suspensión los matraces con caldo T3 a utilizar.
- Incubar los matraces inoculados en shaker a 28 °C, 150 rpm, 5 días.
- Al 4° día preparar frascos con agua destilada y esterilizar en autoclave.
- Al sacar los matraces del shaker, hacer un frotis a partir del contenido de cada matraz, teñir con azul de Coomasie y observar al microscopio óptico por inmersión, para verificar presencia de cristales y esporas, y ausencia de contaminación en el cultivo. Descartar los cultivos que se hayan contaminado o que no hayan producido cristales.
- Repartir el contenido de cada matraz en dos tubos estériles de 50 mL, centrifugar a 4500 g, 5 min, descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 20 mL de agua estéril.
- Repetir el paso anterior (a partir del centrifugado) dos veces.
- Resuspender el pellet de los dos tubos en un volumen final de 10 mL de agua estéril. Guardar la suspensión de esporas y cristales en heladera hasta su uso. Usar antes de las 24 h.
- A partir de 1 µL de la suspensión de esporas y cristales, realizar un frotis en un área de 1 cm² de un portaobjetos, teñir con azul de Coomassie y observar al

⁴ El número de matraces por cepa es muy variable (1-9), según la cantidad de cristales que produzca cada cepa.

microscopio por inmersión. Realizar recuento microscópico de cristales en cinco campos de observación diferentes.

- Realizar el paso anterior por triplicado para cada cepa, y calcular la concentración de cristales/ μL promediando todos los datos.
- Finalmente ajustar por dilución a la concentración deseada. En el caso de *Pseudaletia adultera* esta concentración fue de 1×10^6 cristales/ μL para el screening. Posteriormente realizar diluciones seriadas si se quiere estudiar el efecto dosis-respuesta.

8.2 Protocolo de realización de bioensayos contra larvas de *P. adultera*.

- Calcular con cuántas larvas se dispone para realizar el bioensayo, para planificar cuántas cepas bacterianas evaluar, incluyendo los controles negativo y positivo. Tener en cuenta que hay un pequeño porcentaje de larvas que puede morir en los días previos al ensayo. Realizar al menos 12 réplicas por cada tratamiento.
- Esterilizar servilletas de papel en autoclave.
- Preparar la dieta (Monnerat, Batista et al. 2007) para las larvas de *P. adultera* 24 h antes del día en que se iniciará el bioensayo, para que la preparación enfríe y solidifique correctamente. Tener en cuenta que los porotos se deben dejar en agua un día antes.
- Rotular las placas de Petri estériles a utilizar con el nombre de las cepas, fecha, etc..
- Colocar un trozo de dieta de 2 cm^3 aprox. en cada placa de Petri, y un trozo de servilleta de papel estéril.
- Inocular la dieta superficialmente con $500 \mu\text{L}$ del inóculo preparado y estandarizado, y dejar secar unos minutos.
- Colocar una larva del estadio que se desee evaluar en cada placa de Petri y sellar con Petri-film.
- Dejar las placas en las condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo que se desee evaluar.
- Observar cada 24-48 h para verificar mortalidad de las larvas. O medir las variables que se vayan a evaluar, peso de pupas, % de individuos que alcanzan el estado adulto, etc..