
EVALUACIÓN COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MEXICANAS DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA EL GUSANO COGOLLERO DEL MAÍZ *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOTERA: NOCTUIDAE)

Ma. Fernanda Vázquez-Ramírez, Jonatan Carmen Rangel-Núñez, Jorge E. Ibarra y
Ma. Cristina Del Rincón-Castro

RESUMEN

Se evaluaron y caracterizaron cinco cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con actividad hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* mediante bioensayos, perfiles proteicos, patrones de DNA plasmídico, y PCR. Los bioensayos mostraron que dos de las cinco cepas estudiadas, LBIT-13 y LBIT-418, mostraron alta toxicidad hacia *S. frugiperda*, con CL_{50} de 137,2 y 197,2 ng-cm⁻², respectivamente, al compararse con el estándar comercial HD-1 (CL_{50} de 142 ng-cm⁻²). Asimismo, las cepas LBIT-44, LBIT-383 y LBIT-428 muestra-

ron menores niveles de toxicidad con CL_{50} de 338,2; 474,5; y 523,8 ng-cm⁻²; respectivamente. Los perfiles de proteínas en las cinco cepas mostraron dos proteínas mayoritarias de 130 y 65 kDa. A nivel de patrones de plásmidos, las cinco cepas presentaron diferencias relevantes en cantidad y peso molecular de sus plásmidos. Se detectaron por PCR posibles genes *cry* en tres de las cepas, LBIT-13, LBIT-44 y LBIT-383. Al menos dos cepas poseen potencial para ser utilizados como agentes de control biológico contra el gusano cogollero en México.

Introducción

En México, el maíz es el cultivo agrícola más importante desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. Se produce en dos ciclos productivos: primavera-verano y otoño-invierno, bajo las más diversas condiciones agroclimáticas de humedad, temporal y riego (Polanczyk *et al.*, 2000). Las larvas del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) son una de las principales plagas del maíz en regiones tropicales y subtropicales de América (Vergara *et al.*, 2001); México no es la excepción en cuanto a la presencia de esta plaga en las distintas regiones del país donde se siembra maíz (López-Edwards *et al.*, 1999).

Como muchas otras plagas, el control principal de estos agentes se lleva a cabo mediante el uso convencional de insecticidas químicos. No obstante, existen otros métodos de control para esta plaga, como lo es el control biológico. Éste puede definirse como la utilización de organismos vivos o sus metabolitos para eliminar o reducir daños causados por organismos perjudiciales (Badii y Abreu, 2006). A estos organismos benéficos se les llama agentes de control biológico y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos de insectos (Asaff *et al.*, 2002), los cuales son capaces de mantener la densidad de población de un organismo plaga a un nivel que no cause daños relevantes

y permita la sustentabilidad de los agrosistemas (Rodríguez del Bosque, 2007).

El control microbiano utiliza microorganismos patógenos o sus productos en el control de poblaciones de plagas. Algunos de estos agentes pueden ser muy patogénicos o tóxicos hacia sus hospederos y causar una alta tasa de mortalidad, mientras otros pueden producir solo efectos crónicos. Dentro de estos microorganismos encontramos a los nematodos, virus, hongos, protozoarios y bacterias (Rodríguez del Bosque, 2007). En este último grupo destaca la bacteria *Bacillus thuringiensis*, familia Bacillaceae, una bacteria Gram positivo, aeróbica estricta, de flagelación peritrica que mide 3-5 µm de largo por 1-2 µm de ancho. El genoma de *B. thuringiensis*

fluctúa entre 2,4 y 5,7×10⁶ pares de bases (pb), aunque la mayoría de los aislados tienen varios elementos extracromosómicos o plásmidos. (Schnepp *et al.*, 1998).

Por otro lado, *B. thuringiensis* presenta células vegetativas en forma de bastón que se agrupan en cadenas de dos a tres células. Posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales en el esporangio, además de inclusiones cristalinas de naturaleza proteica solubles en soluciones altamente alcalinas (Sauka y Benintende, 2008). Estos cristales son liberados eventualmente en el medio ambiente cuando las esporas maduran y las células se lisan, y son detectables al microscopio óptico de contraste de fases (Ibarra, 2012). Dichos cristales se componen

PALABRAS CLAVE / *Bacillus thuringiensis* / Control Biológico / Gusano Cogollero / Maíz / *Spodoptera frugiperda* /

Recibido: 12/08/2014. Modificado: 05/05/2015. Aceptado: 10/05/2015.

Ma. Fernanda Vázquez-Ramírez. Ingeniera Agrónoma y estudiante de Maestría en Biociencias, Universidad de Guanajuato (UGto), México.

Jonatan Carmen Rangel-Núñez. Ingeniero Agrónomo y estudiante de Maestría en Biociencias, UGto, México.

Jorge E. Ibarra. Doctor en Entomología, Profesor Investigador,

CINVESTAV-IPN, Irapuato, México.

Ma. Cristina Del Rincón-Castro. Doctora en Biotecnología. Profesora Investigadora, UGto, México. Dirección: Departamento

de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, UGto Campus Irapuato Salamanca. ExHacienda El Copal, Km. 9.0 Carr. Irapuato-León. 36500 Irapuato, Gto. México. e-mail: cdelrincon@ugto.mx

EVALUATION AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS AGAINST THE FALL ARMYWORM *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOTERA: NOCTUIDAE) AND CHARACTERIZATION OF MEXICAN *Bacillus thuringiensis* STRAINS

Ma. Fernanda Vázquez-Ramírez, Jonatan Carmen Rangel-Núñez, Jorge E. Ibarra and Ma. Cristina Del Rincón-Castro

SUMMARY

Five Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* with activity against the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* were evaluated and characterized using bioassays, protein profiles, patterns of plasmid DNA and PCR. The bioassays showed that two of the five strains, LBIT-13 and LBIT-418, showed high toxicity towards *S. frugiperda*, with LC_{50} of 137.2 and 197.2 ng·cm⁻², respectively, when compared with the standard HD-1 (CL_{50} = 142 ng·cm⁻²). Also, LBIT-44, LBIT-383 and LBIT-428 strains

showed lower levels of toxicity with LC_{50} of 338.2, 474.5 and 523.8 ng·cm⁻², respectively. Protein profiles of the five strains showed two major proteins of 130 and 65 kDa. In terms of plasmid patterns, the five strains showed significant differences in quantity and molecular weight of the plasmids. In three strains, LBIT-13, LBIT-44 and LBIT-383, possible cry genes were detected by PCR. At least two strains possess potential for use as biological control agents against the fall armyworm in Mexico.

A AVALIAÇÃO COMO UM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES MEXICANO *Bacillus thuringiensis* CONTRA A LAGARTA DO CARTUCHO *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOTERA: NOCTUIDAE)

Ma. Fernanda Vázquez-Ramírez, Jonatan Carmen Rangel-Núñez, Jorge E. Ibarra e Ma. Cristina Del Rincón-Castro

RESUMO

Foram avaliados e caracterizados cinco cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* com atividade contra a lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* bioensaios, perfis de proteínas, os padrões de DNA plasmidial e PCR. Os ensaios mostraram que duas das cinco estirpes, LBIT-13 e LBIT-418, mostraram alta toxicidade contra *S. frugiperda*, com CL_{50} do de 137,2 e 197,2 ng·cm⁻², respectivamente, quando comparado com a norma HD-1 (CL_{50} = 142 ng·cm⁻²). Além disso, LBIT-44, LBIT-383 e LBIT-428 amostras apresentaram níveis mais baixos de

toxicidade com CL_{50} de 338,2; 474,5 e 523,8 ng·cm⁻², respectivamente. Perfis de proteínas das cinco cepas mostrou duas principais proteínas de 130 e 65 kDa. Em termos de padrões de plasmídeos, os cinco linhagens apresentaram diferenças significativas na quantidade e peso molecular dos plasmídeos. Foram detectados por PCR três genes cry possíveis em as cepas LBIT-13, LBIT-44 e LBIT-383. Pelo menos duas linhagens possuem potencial para uso como agentes de controle biológico contra cartucho do milho no México.

de una diversidad de proteínas denominadas proteínas Cry, las cuales al ser activadas se les denomina δ -endotoxinas (Höfte y Whiteley, 1989). Las proteínas Cry son productos de la expresión de los genes *cry* durante la fase estacionaria (Adang, 1991). Generalmente se acumulan en el compartimiento de las células madre para formar las inclusiones cristalinas, las cuales llegan a representar 20 a 30% del peso seco de las células esporuladas. Las proteínas Cry se dividen en dos grupos: uno con masas moleculares de 130 a 140 kDa, y el otro con masas en el intervalo de 65 a 70 kDa (Schnepf *et al.*, 1998). Estas toxinas presentan actividad insecticida hacia diversos órdenes de insectos, principalmente hacia los grupos Lepidóptera, Díptera y Coleóptera (Adang, 1991). En la actualidad se conoce con bastante precisión el modo de acción de *B. thuringiensis* y se sabe que las diferentes δ -endotoxinas actúan a nivel

de intestino medio de los insectos, formando orificios en el epitelio de este órgano que permiten el paso de contenido intestinal hacia la hemolinfa y viceversa, provocando una parálisis seguida de septicemia que causa la muerte (Schnepf *et al.*, 1998).

La diferencia en los niveles de toxicidad de *B. thuringiensis* depende del tipo de δ -endotoxinas, de las cuales hasta la fecha se conocen cerca de 800 diferentes secuencias nucleotídicas clasificadas como proteínas Cry (Crickmore, 2014). Algunas cepas de *B. thuringiensis* pueden producir varias proteínas Cry, lo cual puede ampliar el alcance tóxico de estas cepas, e igualmente una especie de insecto puede ser susceptible a varias proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998).

La idea de utilizar a *B. thuringiensis* como agente de control biológico del gusano cogollero no es nueva, habiéndose reportado con anterioridad la caracterización de cepas de *B. thuringiensis* con

actividad moderadamente tóxica hacia larvas de este insecto (Del Rincón-Castro *et al.*, 2006). Por otro lado, otros investigadores han reportado elevados niveles de toxicidad de cepas de *B. thuringiensis* contra esta plaga (Dos Santos *et al.*, 2009; Monerat *et al.*, 2010). No obstante, se sabe que de forma natural el gusano cogollero presenta poca susceptibilidad hacia cepas de *B. thuringiensis* y su efecto tóxico se reporta de bajo a moderado (Bohorova *et al.*, 1997). Incluso existen reportes en donde se muestra la resistencia de *S. frugiperda* hacia el maíz transgénico que expresa la proteína Cry1F (Storer *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, se considera de importancia continuar la búsqueda de nuevas cepas de *B. thuringiensis* que posean potencial para desarrollarse como bioinsecticidas, con la finalidad de encontrar nuevos genes *cry* diferentes a los que se utilizan en la actualidad para el control de *S. frugiperda*. En

el presente trabajo se evaluó el efecto tóxico, mediante bioensayos en dieta artificial, de cinco cepas nativas mexicanas de la bacteria *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) sobre larvas del gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* y fueron caracterizadas a nivel molecular mediante perfiles de proteínas, patrones de DNA plasmídico y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de posibles genes *cry*.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas

Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) fueron denominadas LBIT-13, LBIT-44, LBIT-383, LBIT-418 y LBIT-428. Estas se aislaron de suelo, telarañas y filoplano, y fueron proporcionadas por Jorge E. Ibarra Rendón, Laboratorio de Bioinsecticidas, CINVESTAV IPN Unidad Irapuato. Se utilizó como cepa control el estándar HD-1.

Producción de cepas de Btk

Las cepas se sembraron en cajas Petri con medio sólido estéril infusión cerebro-corazón (BHI por sus siglas en inglés) más agar bacteriológico (3,7% BHI; 1,5% agar bacteriológico y agua destilada). Posteriormente se incubaron por 24h a 28°C y se almacenaron a 4°C. Las cepas fueron crecidas luego en matraces Erlenmeyer de 250ml con 50ml de medio de leche peptonizada pH 7,5 (1,0% leche peptonizada; 0,7% dextrosa; 0,2% extracto de levadura; 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,002% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,002% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,002% $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ y agua destilada estéril) y se incubaron a 28°C, por 72-96h, a 280rpm en una incubadora orbital (Shaking Incubator; Shel Lab, Cornelius, OR, EEUU). Posteriormente se lavaron por triplicado con agua destilada estéril y se centrifugaron (Centrífuga Z326K; Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemania) a 4°C, por 10min y 13000rpm hasta obtener los precipitados que fueron congelados y liofilizados. Los productos obtenidos del complejo espора- cristal (CEC) se almacenaron a 4°C.

Bioensayos

Con el CEC de cada cepa de Btk, se realizaron soluciones *stock* (SS) 1:1 (1mg CEC/ml de Tween 80 al 0,02%) y diluciones 1:10 (100µl de SS/900µl de Tween 80 al 0,02%) en tubos Eppendorf. Estas últimas fueron utilizadas para obtener las seis concentraciones empleadas en los bioensayos cuyos valores fluctuaron dentro de un intervalo de 26,03 a 1666ng·cm⁻². Se prepararon 1000µl de cada concentración ensayada, distribuyendo 500µl por caja de Petri (60cm²) conteniendo dieta artificial para *S. frugiperda* (Rangel Núñez *et al.*, 2014). Se utilizaron 20 larvas para cada concentración, distribuyendo 10 larvas por caja. Los bioensayos se mantuvieron bajo condiciones de insectario (80% de humedad relativa, 25°C y

16:8h de luz:oscuridad) por 5 días y los resultados se analizaron mediante análisis probit. Se utilizaron al menos tres repeticiones estadísticamente válidas para estimar la CL₅₀ de cada cepa, cubriendo los siguientes criterios: el valor de la pendiente de la línea de regresión debió estar entre 1,5 y 6; la χ^2 debería ser <5; la división entre el límite fiducial superior y el inferior debería ser <2; la mortalidad natural en el testigo no debería exceder el 10%; la CL₅₀ estimada debería ubicarse por lo menos dos valores debajo de la concentración probada más alta y dos valores arriba de la más baja; la distribución de la mortalidad debería fluctuar entre 90 y 10% dentro de las seis concentraciones probadas; y el coeficiente de variación debería ser <30% (Ibarra y Federici 1987).

Microscopía electrónica de barrido

Las suspensiones del CEC de las distintas cepas se colocaron en portaobjetos cilíndricos de aluminio, se secaron al aire y se recubrieron con oro en una ionizadora E.F. Fullam EMS-76M (Albany, NY, EEUU) por 4min. Las muestras se analizaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-35C, con voltaje de aceleración de 10KV.

Perfil proteico

Se utilizaron geles desnaturantes de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) cuyo geles de concentración se elaboraron con 1,72ml de agua destilada estéril; 25µl SDS 10%; 337,5µl acrilamida 40%; 250µl Tris HCl 1,25M; 2,5µl Temed; y 25µl PSA). El gel de corrida se elaboró con 2,18ml de agua destilada estéril, 1,5ml de acrilamida 40%; 2,24ml Tris 1M; 60µl dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%; 40µl persulfato de amonio (PSA) y 4µl Temed). Las muestras se prepararon en tubos Eppendorf con 10µl de SS de las cepas y el control de Btk. Posteriormente, las

muestras fueron lavadas con agua destilada estéril a 13000rpm por 1min (Espresso Micro-centrifuge; Thermo Scientific). Previo a la corrida, las muestras se resuspendieron en 50µl de solución de Laemmli (amortiguador de carga): 500µl Tris 0,5M; 200µl SDS 20%; 200µl glicerol; 100µl β-mercaptoetanol; y 100µl azul de bromofenol 0,02%) y se hirvieron a baño maría (Mini Wather Bath; Select Bio-Products) a 100°C por 4min.

Para el análisis de proteínas se utilizaron 15µl de cada muestra y 3µl de marcador de peso molecular Benchmark Protein Ladder (Invitrogen). El gel se corrió con el amortiguador de corrida (Tris HCl 0,05M; glicina 0,38M; SDS 0,1%) a 90V por 2,30 horas en una cámara de electroforesis vertical (Mini-PROTEAN Tetra Cell 165 8004; Bio-Rad). Se tiñeron en una solución con azul de Coomassie (2,5g azul brillante de Coomassie G, 450ml de metanol, 90ml de ácido acético y 460ml de agua destilada) con agitación de 50rpm (Orbital Shaker; MRC, Londres, RU) por 15min, y posteriormente se destiñeron en solución de destinción (75ml de ácido acético, 50ml de metanol y 875ml de agua destilada) durante toda la noche. Los geles se analizaron bajo luz blanca en un fotodocumentador (Gel Doc EZ Image; Bio Rad).

Patrones de plásmidos

Las cepas se crecieron en matraces Erlenmeyer de 250ml con 50ml de medio líquido Spizizen (0,2% NH_4SO_4 ; 1,4% K_2HPO_4 ; 0,6% KH_2PO_4 ; 0,1% citrato de sodio; 0,1% casaminoácidos; 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,001% extracto de levadura; y 1ml glucosa 50%), con agitación (Shaking Incubator; Shel Lab) a 28°C, 280rpm por 14h. Se lavaron tres veces con agua destilada estéril en una centrifuga Z326K (Hermle Labortechnik) a 4°C, por 10min a 13000rpm; se les agregaron 20ml de TES frío pH 8 (30mM Tris base, 5mM

EDTA, 50mM NaCl), se resuspendieron en TES sacarosa (sacarosa 20% en TES), se añadieron 300µl de lisozima (2mg·ml⁻¹) y RNasa (1µg·ml⁻¹) para hasta obtener esferoplastos y se incubaron durante 3h a 37°C y 120rpm (Orbital Shaker Incubator; MRC). Los esferoplastos se monitorearon en un microscopio óptico (Axio Lab.A1; Carl Zeiss). Se agregaron 3ml de SDS al 8% en TES y se incubaron a baño maría a 68°C por 10min (Mini Water Bath; Selec Bio-Products). Se agregaron 1,5ml de acetato de sodio 3M pH 4,8 y se incubaron a -20°C por 30min para precipitar proteínas, y se centrifugó a 4°C, por 20min a 13000rpm. El sobrenadante de cada cepa se recuperó filtrándolo, se agregó un volumen de isopropanol y se incubó a -20°C por toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 4°C por 20min a 13000rpm y se resuspendió el DNA plasmídico en 200µl de agua destilada estéril. Los patrones de plásmidos se analizaron en geles de agarosa al 0,6% (0,3g de agarosa Ultra Pure en 50ml de TAE 1X pH 8 (40mM de Tris, 40mM de ácido acético, 1mM de EDTA, 1l de agua destilada estéril) más 1µl de Gel Red, en una cámara de electroforesis horizontal (Horizon 11.14; Biometra) a 25V por 15h, usándose TAE 1X como amortiguador de corrida. Los geles se analizaron y fotografiaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador (Gel Doc EZ Imager).

PCR

Se utilizó el DNA plasmídico para las amplificaciones de los genes *cry*, empleando los oligonucleótidos universales diseñados para reconocer los bloques 1 y 5 conservados de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* (Noguera e Ibarra, 2010). La mezcla de reacción contenía 1µl del oligonucleótido bloque 1 (directo) 5'TATGCWCAAGCWCCTCAATYTWCATYT3'; 1µl del oligonucleótido bloque 5 (reverso) 5'GGRATAAATTCAATTYKRTCWA3'; 3µl de DNA

plasmídico; 5mM de MgCl₂, 0,4mM de dNTP's y 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). La amplificación se realizó en el Termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5min; 30 ciclos a 94°C por 1min; 40°C por 2min; 72°C por 1,5min; y extensión final a 72°C por 7min. Los amplicones obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 0,6%, utilizando el colorante 10X loading buffer y 1µl de marcador 1Kb Plus (Invitrogen) en una cámara de electroforesis horizontal (Mini Sub Cell GT; Bio Rad) a 90V durante 40min. Posteriormente se analizaron y fotografiaron en un fotodocumentador (Gel Doc EZ Imager).

Resultados y Discusión

Bioensayos

En la Tabla I se reportan las CL₅₀ promedio de las cinco cepas analizadas y los parámetros estadísticos estimados mediante el análisis probit. Todas las cepas mostraron niveles de toxicidad considerados como moderadamente tóxicos (Arango *et al.*, 2002); no obstante, dos de ellas (LBIT-13 y LBIT-418) mostraron un elevado nivel de toxicidad hacia *S. frugiperda*, con CL₅₀ de 137,22 y 197,23ng·cm⁻², respectivamente, comparables con los niveles de toxicidad del estándar comercial HD-1 (CL₅₀=142ng·cm⁻²). Esto es destacable, ya que esta plaga se considera como con poca susceptibilidad hacia *B. thuringiensis* (Bohorova *et al.*, 1997). Las cepas con menores niveles de toxicidad fueron LBIT-44 (338,2ng·cm⁻²), LBIT-383 (474,5ng·cm⁻²) y LBIT-44 (344,23ng·cm⁻²); sin embargo, al ser comparadas con un producto comercial a base de HD-1 contra *S. frugiperda* (Ruiz Abdalá *et al.*, 2003), siguen siendo buenas candidatas para ser utilizadas como bioinsecticidas. En trabajos previos realizados por Del Rincón *et al.* (2006) se

reportó la actividad tóxica de cepas de *B. thuringiensis* hacia el gusano cogollero, con valores de CL₅₀ de 7,636; 3,867 y 3,966µg·cm⁻² para las cepas LBIT-27, LBIT-181 y LBIT-193, respectivamente. Estos valores son considerablemente más elevados que los reportados en el presente estudio. Por otro lado, Monnerat *et al.* (2007) realizaron bioensayos con concentraciones de 2 a 2000ng·cm⁻² de CEC de *B. thuringiensis*, obteniendo niveles muy elevados de toxicidad, con CL₅₀ estimadas entre los 18 y 26ng·cm⁻². Es importante destacar que estas CL₅₀ tan bajas, se reportaron contra una población brasileña de gusano cogollero y sería interesante probar los aislamientos brasileños contra la población mexicana de *S. frugiperda*, para corroborar si ésta también es tan susceptible como la plaga de Brasil, ya que en trabajos previos se ha encontrado que la plaga mexicana es más resistente al efecto de *B. thuringiensis* que las cepas brasileñas (Monnerat *et al.*, 2006). Estos bajos valores no han sido reportados por otros autores y la mayoría de los trabajos relacionados con el uso de *B. thuringiensis* contra el gusano cogollero reportan CL₅₀ >200ng·cm⁻² (López Edwards *et al.*, 1999; Monnerat *et al.*, 2006; Zenner de Polanía *et al.*, 2008).

Perfil proteico

Las cepas estudiadas mostraron la presencia de dos proteínas mayoritarias de 130 y

65kDa (Figura 1). En comparación con la cepa control HD1 y de acuerdo a la división de Schnepf *et al.* (1998), al poseer las mismas proteínas, éstas también deberían de pertenecer a los grupos de proteínas Cry1 y Cry2. Estas proteínas nos permiten asociarlas a la morfología del cristal. Se pudo observar mediante microscopía electrónica de barrido que todas las cepas presentaron cristales bipiramidales y cúbicos (Figura 2, donde se muestra la imagen de la cepa LBIT-418 solamente, ya que el resto de las cepas fueron idénticas). Los cristales bipiramidales se asocian con la proteína de 130kDa mientras que los cúbicos se asocian con la de 65kDa (Del Rincón Castro *et al.*, 2006). Ambas proteínas son un indicativo de la toxicidad de las cepas hacia insectos del orden Lepidóptera y se encontraron presentes en las

cinco cepas nativas estudiadas. Adicionalmente, esto concuerda con el peso molecular de las proteínas de *B. thuringiensis*, analizadas en trabajos previos, para cepas que poseen actividad tóxica hacia *S. frugiperda* (Dos Santos *et al.*, 2009; Monerat *et al.*, 2006).

Patrones de plásmidos

En el presente trabajo se caracterizaron mediante los patrones de plásmidos a las cinco cepas estudiadas, y éstas se compararon con la cepa estándar HD-1. Para LBIT-13 se obtuvieron 10 plásmidos (Figura 3a) con pesos moleculares aproximados de 16000 (1), 11000 (2), 9900 (3), 9000 (4), 8066 (5), 5700 (6), 4600 (7), 4500 (8), 3700 (9) y 2067 (10) pb. La cepa LBIT-44 presentó 12 plásmidos (Figura 3b) con la presencia de un megaplásmido de 16000 (1) ausente en la cepa LBIT-13 pero presente en todas las demás cepas y en el estándar HD-1. Esta cepa también presentó tres plásmidos de 7045 (6), 6030 (7) y 2972 (11) ausentes en la cepa LBIT-13 y en el estándar HD-1; el resto de los plásmidos fueron similares a los de las demás cepas. La cepa LBIT-383 mostró 11 plásmidos (Figura 3c) similares en peso a los de LBIT-44, pero no se pudo detectar el plásmido de 9900pb presente en ésta última y en LBIT-13. Asimismo, esta cepa LBIT-383 no presentó el plásmido de 5700pb que sí se observó en las cepas LBI-13, 44, 418 y 428. Por otro lado, la cepa LBIT-418, reveló la presencia de 11 plásmidos

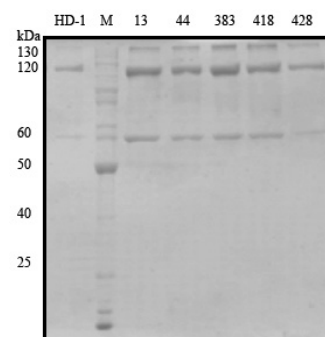


Figura 1. Perfiles proteicos de las cepas de estudio de Btk. Carril HD-1: cepa estándar HD-1, carril M: marcador de peso molecular (Benchmark), carril 13: LBIT-113, carril 44: LBIT-44, carril 383: LBIT 383, carril 418: LBIT 418, y carril 428: LBIT428.

TABLA I
PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA ESTIMAR LAS CONCENTRACIONES LETALES DE LAS CEPAS DE BTK CONTRA EL GUSANO COGOLLERO DEL MAÍZ *S. frugiperda*

Cepa	CL ₅₀ (ng·cm ⁻²)	CL ₉₅ (ng·cm ⁻²)	LFI	LFS	LFS/LFI	P	χ ²	MN (%)	DM	CV (%)
LBIT-13	137,2	1557,5	92,8	205,7	2,2	1,9	4,6	4	A	13
LBIT-44	338,2	6973,1	220,2	545,1	2,8	2,7	5,1	7	A	12
LBIT-383	474,5	4780	320	722	2,3	3,3	2,3	8	A	11
LBIT-418	197,2	11900	89,3	486	6,3	2,7	3,2	8	A	27
LBIT-428	523,8	10239,8	271,4	1013,9	3,7	1,3	4	9	A	7
HD-1	142	568,45	102,6	197,7	1,9	3,0	6,0	8	A	20

CL₅₀: concentración letal media, CL₉₅: concentración letal al 95%, LFI: límite fiducial inferior, LFS: límite fiducial superior, MN: mortalidad natural, DM: distribución de la mortalidad, A: aceptada, CV: coeficiente de variación.

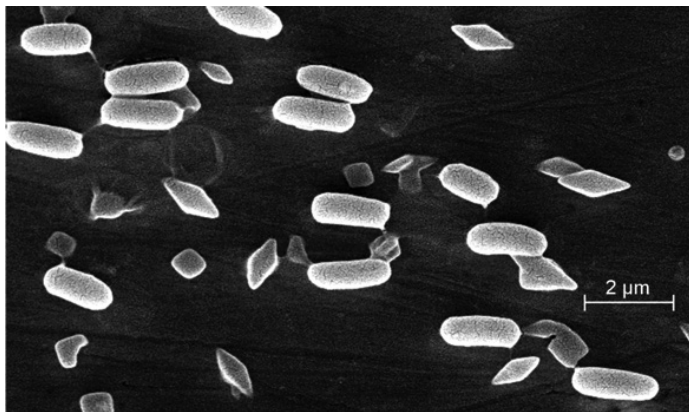


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido de la cepa LBIT-418.

(Figura 3d) muy similares a los de LBIT-383, con la presencia adicional de un plásmido exclusivo de 5500pb que no se detectó en ésta última ni en el resto de las cepas estudiadas. En la cepa LBIT-428 se observó un total de 10 plásmidos (Figura 3e), todos del mismo peso molecular que los observados para LBIT-418, pero con la ausencia del plásmido exclusivo de 5500 de ésta, y de los plásmidos de 2972 y 2067pb que sí presentaron el resto de las cepas estudiadas. Finalmente, en la cepa control, HD-1, solo se detectaron cinco plásmidos (Figura 3f) de pesos moleculares aproximados de 16000 (1), 8066 (2), 5012 (3), 4000 (4) y 2067(6) pb, patrón idéntico al reportado por Monnerat *et al.* (2006).

Las proteínas Cry que conforman el cristal paraesporal, son codificadas por los genes

cry que se encuentran generalmente en grandes plásmidos y éstos permiten establecer diferencias entre una cepa y otra, dándoles identidad propia (Schnepf *et al.*, 1998). En *B. thuringiensis* se pueden reconocer dos grupos diferentes de plásmidos (González *et al.*, 1981): los plásmidos pequeños (<10000pb) y los denominados megaplásmidos (>10000pb). Los primeros generalmente están presentes en alto número de copias y no tienen función específica conocida, mientras que los megaplásmidos están presentes en bajo número de copias y su función principal es albergar a los genes *cry*, aunque la secuenciación de algunos de estos plásmidos indica la ocurrencia de otros genes importantes (Reyes-Ramírez e Ibarra 2008). De tal manera que el establecimiento del patrón de plásmidos de las cepas de *B. thuringiensis*

constituye un parámetro muy importante para determinar su originalidad, ya que el número y tamaño de éstos se asocia a un tipo particular de cepa.

En el presente trabajo se evidenciaron las diferencias en los patrones plasmídicos de las cepas en estudio y el estándar HD-1, sobretodo en las cepas LBIT-418 y LBIT-428. En LBIT-13 se observaron plásmidos de alto peso molecular que no estaban presentes en el estándar HD-1, de alrededor de las 11000 y 10000pb (Figura 3a). Asimismo, las cepas LBIT-44, 383 y 418, presentaron un plásmido de 3000pb, ausente en las cepas LBIT-13, 428 y el estándar HD-1. Por otro lado, la cepa LBIT-428, fue la única que presentó un triplete de plásmidos de entre 5000 y 3000pb, los cuales estaban ausentes en el resto de las cepas (Figura 3e). Adicionalmente, las cepas LBIT-383, 418 y 428, presentaron mayores homologías en entre sí en los plásmidos de alto peso molecular (>10000pb) en relación con los plásmidos de LBIT-13, LBIT-44 y el estándar HD-1. Finalmente, la caracterización de los plásmidos en las cepas de estudio, demostró sus diferencias a nivel genético, pero es necesario establecer si hay una conexión entre la presencia de un plásmido en común y el nivel de toxicidad entre cepas. Según los resultados obtenidos en este trabajo, las cepas LBIT-13 y LBIT-418 presentaron niveles de toxicidad muy similares pero patrones de plásmidos muy distintos entre ellas y al estándar HD-1.

Identificación de genes *cry* por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación de genes son parte integral y esencial en la investigación agronómica y el desarrollo de productos biomoleculares para el hallazgo de nuevos genes *cry* en las cepas de *B. thuringiensis* que podrían ser utilizadas como insecticidas o para la construcción de organismos modificados genéticamente (Sauka *et al.*,

2007). Debido a lo anterior, se realizó la identificación de genes *cry* en las cepas de estudio utilizando oligonucleótidos específicos para ello, los cuales fueron diseñados previamente por Noguera e Ibarra (2010). Se detectaron potenciales genes *cry* como amplicones de 1300pb en las cepas LBIT-13, LBIT-44 y LBIT-383 (Figura 4, carriles 13, 44 y 383). Dichos amplicones fueron muy similares en tamaño al obtenido para el control HD-1, el cual fue de ~1300pb y correspondieron al tamaño de amplicón esperado cuando se utilizan los oligonucleótidos bloques 1 y 5 (Figura 4, carril HD-1) (Noguera e Ibarra, 2010).

Sorprendentemente no se obtuvieron amplicones en las cepas LBIT-418 y 428 (Figura 4, carriles 418 y 428). Una explicación podría ser que las estrategias basadas en el uso del PCR en general son eficientes, sencillas y rápidas en la identificación de genes *cry*, pero dependen de la universalidad de los iniciadores utilizados, lo que afecta la eficiencia en la identificación de genes *cry* nuevos con diferencias a nivel de DNA con los ya conocidos (Porcar y Juárez-Pérez, 2003). A nivel de genes *cry* en *B. thuringiensis* se conocen cinco regiones conservadas designadas como bloques o dominios, los cuales están presentes en casi todos los genes *cry* (Ben-Dov *et al.*, 2001). En este trabajo solamente se utilizaron oligonucleótidos que reconocían a dos de los cinco dominios presentes en los genes *cry* (bloques 1 y 5). Debido a lo anterior se podría especular que los genes *cry* en las cepas donde no hubo amplificación, tal vez no fueron reconocidos por los oligonucleótidos empleados y podrían representar, potencialmente, nuevos genes *cry*. Es recomendable realizar nuevos PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados para los otros bloques conservados de los genes *cry*, para identificar la naturaleza de los mismos. En trabajos previos (Monnerat *et al.*, 2007; Hercos Valicente *et al.*, 2010) también se identificaron genes *cry* potenciales,

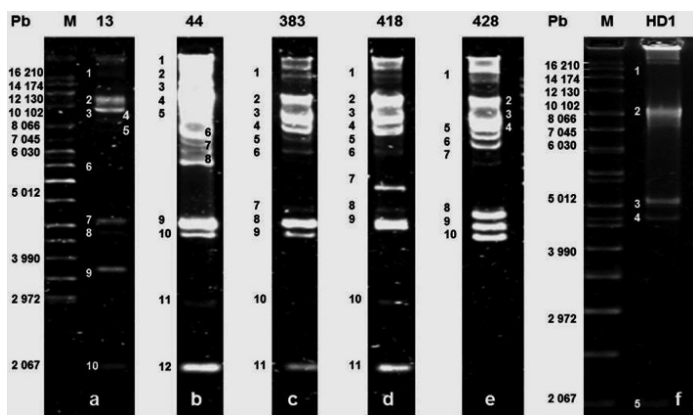


Figura 3. Patrones de plásmidos de las cepas de Btk. a: LBIT-13, b: LBIT-44, c: LBIT-383, d: LBIT-418, e: LBIT-428, f: HD-1 (cepa estándar), Pb: pares de bases, M: marcador de peso molecular.

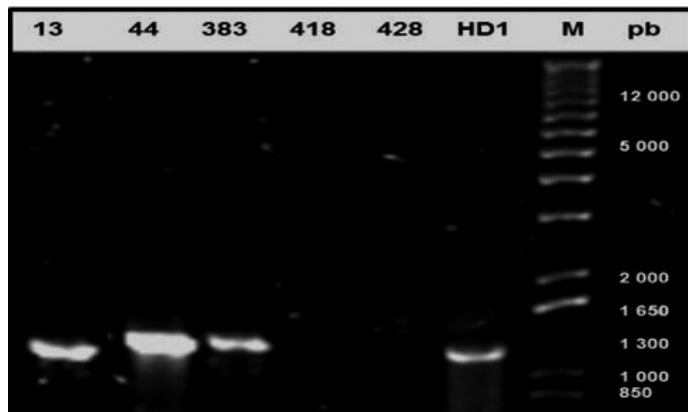


Figura 4. Amplicones obtenidos para las cepas de Btk. Carril 13: LBIT-13, carril 44: LBIT-44, carril 383: LBIT-383, carril 418: LBIT-418, carril 428: LBIT-428, carril HD1: HD-1. M: Marcador de peso molecular (Ladder 1 kb, Invitrogen). pb: pares de bases.

pero se utilizaron oligonucleótidos específicos para identificar los genes *cry1* y *cry2*, mientras que en el presente trabajo no se buscaron estos genes de manera puntual, sino que se utilizaron oligonucleótidos diseñados para identificar cualquier gen *cry*, sobretodo genes nuevos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Javier Luévano Borroel y Regina Basurto Ríos por el apoyo técnico brindado.

REFERENCIAS

Adang MJ (1991) *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action, and utilization. En Maramorosch K (Ed.) *Biotechnology for Biological Control of Pest and Vectors*. CRC Press. Boca Ratón, FL; EEUU. pp. 4-24.

Arango JA, Romero M, Orduz YS (2002) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Appl. Microbiol.* 92: 466-474

Asaff TA, Reyes VY, López LVE, De la Torre YM (2002) Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avanc. Perspect.* 21: 291-295

Badii MH, Abreu YJL (2006) Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Int. J. Good Cons.* 1: 82-89

Ben-Dov E, Manasherob R, Zaritsky A, Barak A, Manglith Y (2001)

PCR Analysis of *cry7* genes in *Bacillus thuringiensis* by five conserved block of toxins. *Curr. Microbiol.* 42: 96-99.

Bohorova N, Cabrera M, Abarca C, Quintero, R, Maciel AM, Brito RM, Hoisington, D, Bravo A (1997) Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412-415.

Crickmore N (2014) http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/ (Cons. 09/07/2014).

Del Rincón-Castro MC, Méndez-Lozano J, Ibarra JE (2006) Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Fol. Entomol. Mex.* 45: 157-164.

Dos Santos KB, Neves P, Meneguim AM, dos Santos RB, dos Santos WJ, Villas Boas G, Dumas V, Martins E, Botelho Praça L, Queiroz P, Berry C, Monnerat R (2009) Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* 50: 157-163.

González JM, Dulmage HT, Carlton BC (1981) Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 5: 351-356.

Hercos Valicente F, de Toledo Picoli EA, Vilaça de Vasconcelos MJ, Portillo Carneiro N, Almeida Carneiro A, Teixeira Guimarães C, Lana UG (2010) Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* *cry1* genes from Brazilian strains effective

against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Biol. Control* 53: 360-366.

Höfte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.

Ibarra JE, Federici BA (1987) An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 3: 187-192.

Ibarra JE (2012) Las bacterias como agentes de control biológico. En Ibarra JE, Martínez-Órtiz P (Eds) *Memorias XXIII Curso Nacional de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. pp. 122-131.

Noguera PA, Ibarra JE (2010) Detection of new cry genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6150-6155.

Lopez-Edwards M, Hernandez-Mendoza JL, Pescador-Rubio A, Molina-Ochoa J, Lezama-Gutierrez R, Hamm JJ, Wiseman BR (1999) Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. *Flo. Entomol.* 82: 254-262.

Monnerat R, Martins E, Ordúz S, Benintende G, Cozzi J, Dolores Real M, Martínez-Ramírez A, Rausell C, Cerón J, Ibarra JE, Del Rincón-Castro MC, Espinoza AM, Meza-Basso L, Cabrera L, Sánchez J, Soberon M, Bravo A (2006) Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7029-7035.

Monnerat R, Cardoso Batista A, Telles de Medeiros P, Soares Martins E, Melatti Botelho Praça L, Fiuza Dumas V, Morinaga C, Demo C, Menezes Gomes AC, Falcão R, Brod C, Siqueira J, Silva-Werneck, Berry C (2007) Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biol. Control* 41: 291-295.

Polaczyk RA, da Silva RFP, Fiuza LM (2000) Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz. J. Microbiol.* 31: 165-167.

Porcar M, Juárez-Pérez V (2003) PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 419-432.

Rangel-Núñez JC, Vázquez-Ramírez MF, Del Rincón-Castro MC

(2014) Caracterización biológica y molecular de cepas exóticas de Baculovirus SfNPV, con actividad bioinsecticida hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Inter-ciencia* 39: 320-326.

Reyes-Ramírez A, Ibarra JE (2008) Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 125-129.

Rodríguez del Bosque LA (2007) Fundamentos ecológicos del control biológico. En Rodríguez del Bosque LA, Arredondo-Bernal HC (Eds.) *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. pp. 19-35.

Ruiz Abdala EM, Cabral Antúnez CC, Pino Quintana C (2003) Eficiencia de *Bacillus thuringiensis* línea HD-1 en el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith), Lepidoptera: Noctuidae en condiciones de campo y de laboratorio en el cultivo de maíz dulce *Zea mays Saccharata*. *Invest. Agr.* 6: 10-14.

Sauka, DH, Amadio AF, Zandomeni RO, Benintende GB (2007) Strategy for amplification and sequencing of insecticidal cryIA genes from *Bacillus thuringiensis*. *Ant. van Leeuwenhoek* 91: 423-430.

Sauka DH, Benintende GB (2008) *Bacillus thuringiensis*: generalidades: un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Arg. Microbiol.* 40: 124-140.

Schnepf EN, Crickmore J, Van Rie L, Lereclu J, Baum J (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62: 775-806.

Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM (2010) Discovery and characterization of field resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J. Econ. Entomol.* 103: 1031-1038.

Vergara O, Pitre H, Parvin D (2001) Economic evaluation of lepidopterous pests in intercropped sorghum and maize in southern Honduras. *Trop. Agric.* 78: 190-199.

Zenner de Polanía I, Álvarez Rodríguez JA, Arévalo Maldonado HA, Mejía Cruz R, Bayona MA. 2008. Susceptibilidad de cuatro noctuidos plaga (Lepidoptera) al gene CryIAc del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodón. *Rev. Col. Entomol.* 34: 41-50.