

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/230682591>

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOLÓGICA DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL CONTROL DE *Tuta absoluta* (Meyrick: Lepidoptera: Gelechiidae), INSECTO PLAGA DEL...

Article · August 2010

CITATION

1

READS

700

5 authors, including:



[Luz Stella Fuentes Quintero](#)

Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano

17 PUBLICATIONS 105 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Javier Hernandez](#)

Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano

1 PUBLICATION 1 CITATION

[SEE PROFILE](#)

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOLÓGICA DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL CONTROL DE *Tuta absoluta* (Meyrick: Lepidoptera: Gelechiidae), INSECTO PLAGA DEL TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL NATIVE STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* FOR CONTROL *Tuta absoluta* (Meyrick: Lepidoptera: Gelechiidae), INSECT PEST OF TOMATO (*Lycopersicon esculentum*)

L. Ramírez¹; N. Ramírez¹; L. S. Fuentes²; J. Jiménez²; J. Hernández^{3*}.

¹ Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana,

² Investigadores CIIA, Universidad Jorge Tadeo Lozano

³ Profesor-Investigador Universidad Jorge Tadeo Lozano. javier.hernandez@utadeo.edu.co

Recibido: Septiembre 10 de 2009

Aceptado: Marzo 15 de 2010

*Correspondencia del autor. Universidad Jorge Tadeo Lozano. javier.hernandez@utadeo.edu.co

RESUMEN

Se recolectaron 28 muestras de suelo en 14 municipios en Colombia. Se aislaron bacilos esporulados, que se caracterizaron microscópicamente cuantificando cristales. Los aislamientos positivos para cristales se sometieron a una caracterización bioquímica por medio de electroforesis de proteínas totales (SDS-PAGE). Las cepas positivas para la presencia de genes *cry1* fueron sometidas a dos rondas de M-PCR con 2 mezclas de oligonucleótidos, reconociendo 6 genes específicos. Se aislaron 99 bacilos esporulados nativos que presentaron cristales con formas amorfas, bipiramidal, cuadradas, redondas y triangulares. Se observaron bacilos con 1, 2, 3 y 4 formas de cristal, estableciéndose 18 perfiles diferentes. Por SDS, se evidenciaron bandas de proteínas de 28 hasta 150 kDa clasificándose en 7 por su posible actividad biológica, lo que originó 28 perfiles diferentes. 35 bacilos esporulados presentaron genes *cry1*, y en estos, se detectaron por M-PCR los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C* y *cry1D* en el 76, 26, 21, 35, 32, y 8,8% respectivamente. De acuerdo a estas caracterizaciones se seleccionaron 10 aislamientos nativos como promisorios para el control de *Tuta absoluta* y se retaron contra larvas de 2do instar de este insecto plaga. Los bacilos nativos ZBUJTL39 y ZCUJTL11 presentaron una mejor actividad biológica que la cepa de referencia Bt var *kurstaki* HD1. El bacilo nativo ZCUJTL11 presentó una CL₅₀ de 2,4 µg/ml (P<0,05). La metodología estandarizada selecciona las cepas de acuerdo a su actividad biológica potencial, como un paso previo a los ensayos biológicos, Este resultado es promisorio para posteriores investigaciones en ingeniería genética de tomate, para la obtención de cultivares autorresistentes a *Tuta absoluta*.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, *Tuta absoluta*, *Lycopersicum esculentum*, SDS-PAGE, PCR, Ensayos biológicos.

ABSTRACT

Were collected 28 soil samples in 14 municipalities in Colombia. Sporulated bacillus were isolated, characterized microscopically by quantifying crystals. Isolates positive for crystals were subjected to biochemical characterization by electrophoresis of total proteins (SDS-PAGE). The strains positive for the presence of *cry1* genes were subjected to two rounds of M-PCR with two oligonucleotide mixtures, recognizing specific genes. 99 bacillus were isolated forms filed with amorphous crystals, bipiramidal, square, round and triangular. Bacillus were observed with 1, 2, 3 and 4 forms of glass, with 18 different profiles. For SDS, showed protein bands of 28 to 150 kDa in 7 classified by their potential biological activity, resulting in 28 different profiles. 35 sporulated bacillus showed *cry1* genes, and these were detected by M-PCR gene *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C* and *cry1D* in 76, 26, 21, 35, 32, and 8.8% respectively. According to these characterizations 10 isolates were selected as promising for the control of *Tuta absoluta* and challenged against the 2nd instar larvae of this insect pest. Strain ZBUJTL39 and introduced ZCUJTL11 better biological activity that the reference strain Bt. var *kurstaki* HD1. strain ZCUJTL11 presented a LC_{50} of 2.4 mg / ml ($P < 0.05$). The methodology selected strains according to their potential biological activity, as a preliminary step to biological tests, this result is promising for further research into genetic engineering of tomato cultivars to obtain resistant to *Tuta absoluta*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Tuta absoluta*, *Lycopersicon esculentum*, SDS-PAGE, PCR, biological testing.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Millano) es uno de los cultivos más importantes en Colombia, esta hortaliza presenta gran demanda en la dieta alimenticia y genera empleo e ingresos, no sólo en el campo, sino también en la agroindustria. Las variedades más cultivadas son Milano y Chonto que se producen entre 600 y 1.200 m.s.n.m (1). En Colombia la superficie destinada a este cultivo fue aproximadamente de 15.881 hectáreas (ha), con una producción de 420.419 toneladas (ton) y un rendimiento de 26,5 ton/ha en el año 2006 (www.agronet.gov.co).

Esta solanácea es afectada por una gran cantidad de plagas y enfermedades dentro de las cuales se destaca el daño causado por las larvas de *Tuta absoluta* (*Lepidoptera: Gelechiidae*). El cogollero del tomate *Tuta absoluta* es considerado una de las plagas de gran importancia económica del tomate en Colombia (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. <http://intranet.corpoica.org.co>), el daño causado por *T. absoluta* en plantas de tomate representa un 27- 43% (2), debido a que afecta directamente la producción del cultivo. Este daño es causado por larvas de la plaga, que minan el follaje y los tallos de las plantas, y atacan las hojas jóvenes, ramas, perforando además flores y frutos (3; 1) lo que ocasiona un debilitamiento gradual en la planta disminuyendo su potencial productivo.

Para el control de *T. absoluta* los agricultores utilizan principalmente insecticidas químicos, que ocasionan efectos nocivos al ambiente, generación de resistencia, aparición de residuos químicos en los alimentos, contaminación de las aguas, eliminación de la fauna benéfica y problemas para la salud humana.

Como alternativa, para el control sostenible de plagas se encuentra el Manejo Integrado de Plagas (MIP), uno de los componentes del MIP, es el control biológico de plagas, del cual hace parte el uso de microorganismos entomopatógenos que ha logrado gran desarrollo a nivel mundial, debido a los avances en su industrialización y presenta un menor impacto ecológico.

Dentro de los entomopatógenos más utilizados se encuentra la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) dominando el 90% del mercado mundial de bioplaguicidas (4). Bt es una bacteria aeróbica, Gram positiva, que se caracteriza por la producción de cristales paraesporales, compuestos por Proteínas Insecticidas de Cristal ICP's (del inglés, Insecticidal Crystal Proteins) (5). Bt posee alta especificidad sobre larvas de insectos de los órdenes lepidóptera, díptera y coleóptera (6), recientemente se comprobó su efecto sobre individuos de: himenóptera, hemiptera, malófaga, ortóptera, y otros grupos de organismos como nemátodos, ácaros, protozoarios, (4) babosas y caracoles (7). Además otras toxinas no insecticidas ni hemolíticas que presenta Bt han mostrado actividad sobre células cancerígenas humanas. (8; 9). Bt

es altamente inocua para plantas, mamíferos, aves anfibios y reptiles (9) e inclusive otros insectos benéficos.

Debido a la importancia que tiene el control de insectos plaga del orden lepidóptero y la necesidad eminente de proponer alternativas para el control de *T. absoluta*, la búsqueda en Colombia de nuevos genes *cry* que codifiquen para nuevas y novedosas delta-endotoxinas con un espectro de acción más amplio, continúa siendo un proyecto de gran interés. En este trabajo se aislaron y caracterizaron cepas de *B. thuringiensis* con genes específicos de la familia *cry1*, con actividad anti lepidóptera a partir de suelos en los que se cultiva tomate en cuatro departamentos de Colombia: Cundinamarca, en los municipios de Susa y Chía; Boyacá, en los municipios de: Villa de Leyva, Sutamarchán, Raquirá y Santa Sofía; Huila, en el municipio de Garzón; y Santander, en los municipios de: Piedecuesta, Los Santos, Lebrija, Betulia, Floridablanca Rionegro y Girón. Se identificaron genes específicos para poder seleccionar bacilos nativos esporulados y estimar su potencial sobre larvas de 2do instar de *T. absoluta*, para de esta manera identificar bacilos nativos potenciales para el control de esta plaga. Adicionalmente se conformó un banco de bacilos nativos esporulados caracterizados a nivel molecular de acuerdo a la presencia de genes *cry1* como un paso previo a la realización de ensayos biológicos, que permiten confirmar la efectividad de un aislamiento nativo en el control de una determinada plaga.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Biología Molecular y de Entomología Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales (CIAA) de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL), ubicados en Bogotá y en Chía Cundinamarca, respectivamente, además, se realizaron experimentos puntuales en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional en Bogotá (IBUN).

Cepas de Referencia

Para la estandarización de la metodología y como control positivo se utilizaron cepas de referencia de Bt var. *kurstaki* HD1, aislada del producto comercial Dipel®, que presenta los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia3*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y Bt var. *aizawai* HD137 que

presenta los genes *cry1Aa*, *cry1Ba*, *cry1Ca*, *cry1Da*, del producto comercial Xentari® ambos de la casa comercial Valent Bioscience.

Obtención de muestras de suelo, área de estudio.

Las muestras de suelos se obtuvieron de diferentes regiones productoras de tomate, dentro del territorio Colombiano. Cundinamarca, en los municipios de Susa y Chía; Boyacá, en los municipios de: Villa de Leyva, Sutamarchán, Raquirá y Santa Sofía; Huila, en el municipio de Garzón; y Santander, en los municipios de: Piedecuesta, Los Santos, Lebrija, Betulia, Floridablanca Rionegro y Girón. Las muestras se recolectaron en campo abierto por duplicado.

Procesamiento de las muestras

Un gramo de suelo se transfirió a nueve mililitros de PBS (0.002 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.008 M Na_2HPO_4 anhidro, 0.02 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.15 M NaCl) y se incubaron a 30°C por 4 horas. Luego se realizó un choque térmico a 80°C durante 10 minutos para recuperar únicamente microorganismos esporulados (10). Se prepararon tres diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), de las cuales se sembraron 100 μl en cajas de petri en medio de cultivo Luria Bertani (LB) (10 g/l tripton, 10 g/l NaCl, 5 g/l extracto de levadura, 13 g/l de agar) y se incubaron a 30°C durante 24 horas. La selección de las colonias cultivadas en LB se basó en las características macroscópicas de las mismas, teniendo en cuenta que las colonias típicas de *B. thuringiensis* son grandes, irregulares, blancas, cremosas y opacas. Una vez seleccionadas las colonias que por sus características podrían corresponder al microorganismo de interés, se realizó una siembra por agotamiento en agar LB y se incubaron a 30°C por 24 horas.

Caracterización microscópica de los aislamientos nativos

Se realizaron caracterizaciones microscópicas, inicialmente con una coloración de Gram de un cultivo de 24 horas de incubación en medio LB, con el fin de confirmar las características morfológicas y la clasificación, según el fundamento de ésta tinción, de cada una de las cepas en estudio. Posteriormente, se realizó una tinción diferencial (safranina-verde de malaquita) de las colonias aisladas, que se incubaron en agar LB durante siete días a 30°C, para evidenciar la presencia de esporas y cristales, los cuales se cuantificaron mediante observa-

ción en microscopio óptico Nikon (100X), asignando:

- (+): 1-10 cristales y esporas por campo óptico.
 - (++): 10-20 cristales o esporas por campo óptico.
 - (+++): Más de 20 cristales ó esporas por campo óptico.
- (11).

Las cepas que presentaron más de 20 cristales por campo óptico, se les realizó un segundo análisis mediante observación y registro fotográfico en microscopio contraste de fase (400X).

Caracterización Bioquímica SDS-PAGE

Se empleó la metodología de Laemmli (1970). Para ello se realizó un “gel de separación” al 14,8% y el “gel compactador” al 5%. El corrido electroforético se llevó a cabo en una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN TETRA-BIO RAD, y se utilizó el Marcador de peso molecular de Proteínas “BROAD RANGE Protein Molecular Weight Markert” (Promega, USA). Los corridos electroforéticos se llevaron a cabo a 200 voltios durante 60 minutos y los geles se tiñeron con solución colorante de Azul de Coomassie R-250 al 0.1% durante una hora a 150 rpm en el SHAKER marca LAB-LINE® ORBIT ENVIRON-SHAKER, para posterior lavado y decoloración del fondo durante 4 horas en metanol ácido acético (40%-10%). Una vez decolorados los geles, se determinó el peso molecular de las bandas de proteínas presentes en cada muestra según el marcador de peso molecular utilizado. Estos perfiles de proteínas totales fueron comparados con los perfiles de la cepa de referencia *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1.

-Obtención de extractos crudos: Los aislamientos nativos y la cepa de referencia se sembraron en el medio de cultivo LB modificado (10 g/l de triptona, 10 g/l NaCl, 5 g/l extracto de Levadura, 4 g/l sulfato de Amonio, 13 g/l agar) (12) y se incubaron a 30°C, durante 7 días. Toda la biomasa celular se resuspendió en agua destilada desionizada y posteriormente los extractos crudos fueron sonicados a una amplitud del 36% con 12 pulsos por 120 segundos, utilizando el equipo “Sonic Vibra Cell, 750 W”, (Laboratorio de Epidemiología Molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional en Bogotá, IBUN). Finalmente, se realizó el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Se mezcló 1:2 del extracto crudo de proteína y el buffer Laemmli, se colocó en baño maría en ebullición durante 10 minutos, y se sirvieron 20 µl de cada una de las muestras en

los pozos del gel.

Caracterización Molecular

-Extracción de ADN: Para la obtención de ADN plasmídico y ADN total, de buena calidad para ser utilizado en la caracterización molecular por PCR, se utilizaron los kits; “Extracción por Kit Ultra Clean™ 6 minutos mini plasmid prep kit para ADN plasmídico y Kit Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit” para ADN general de la casa comercial fabricante (Bio-Line USA). 1 µl de ADN obtenido de cada aislamiento esporulado se sembró en el gel.

-Amplificación por PCR de genes *cry1*: Se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (del Polymerase Chain Reaction). Para llevar a cabo esta reacción, se seleccionaron pares de oligonucleótidos reportados previamente para la amplificación por PCR de fragmentos de los genes de las familias *cry1* (13), que reconoce los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ad*, *cry1Ac*, *cry1Ae*, *cry1Af*, *cry1Ba*, *cry1Bb*, *cry1Bc*, *cry1Ca*, *cry1Cb*, *cry1Da*, *cry1Db*, *cry1Ea*, *cry1Fa*, *cry1Eb*, *cry1Fb*, *cry1G*, *cry1Ha*, *cry1Ia*, *cry1Ib*, *cry1Ja*, *cry1Jb* y *cry1K*., con peso que varían entre 543- 594 pb. Para la amplificación por PCR de genes *cry1* se utilizó ADN extraído de la cepa de referencia *Bt* var. *kurstaki* HD1 y de los bacilos nativos esporulados aislados.

-Amplificación por PCR de genes *cry1* específicos: Los aislamientos nativos esporulados positivos para la presencia de genes *cry1* fueron sometidos a dos rondas de PCR múltiple a partir de 2 mezclas de 6 oligonucleótidos cada una, reconociendo 3 genes específicos en cada reacción de PCR. Los oligonucleótidos, que se emplearon en la PCR múltiple, fueron diseñados en secuencias conservadas para cada gen específico (14), que reconoce los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C* y *cry1D*. Las condiciones preliminares de amplificación para la Mezcla A fueron: Una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, para 35 ciclos de amplificación (con un ciclo que consistía en la denaturación a 94°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto, elongación a 72°C por 1 minuto), y una elongación final a 72°C por 10 minutos.

Para la Mezcla B las condiciones de amplificación fueron: Una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, para 35 ciclos de amplificación (con un ciclo que consistía en la denaturación a 94°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto, elongación a 72°C por 1

minuto), y una elongación final a 72°C por 10 minutos.

-Electroforesis de ADN en gel de agarosa: Para evidenciar la presencia de los genes amplificados *cry1* por PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,0%, y para los genes amplificados *cry1* específicos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3%, ambas en tampón TBE 0,5 X, y se corrió en una cámara Horizontal Gel XL Ultra V-2 Labnet International. Los productos amplificados se tiñeron con buffer de carga azul de bromofenol y se sembraron 10 µl en cada pozo. La electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios durante 60 minutos, y los productos de amplificación se fotografiaron en el fotodocumentador “UVP Gel-Doc-ITTM Imaging System” (UVP LSC. USA”).

Cuantificación de Proteínas de Extractos Crudos

-Obtención de Extractos crudos: Para la obtención de esporas y cristales de los aislamientos nativos seleccionados para el bioensayo, los bacilos se cultivaron en 100 ml de medio de cultivo leche peptonizada modificada (triptona 10 g, dextrosa 10 g, extracto de levadura 2 g, MgSO₄·7H₂O 0,3 g, FeSO₄·7H₂O 20 mg, ZnSO₄·7H₂O 20 mg, MnSO₄ 20 mg, 1 litro de agua, pH: 7,2), con agitación a 340 rpm en el Shaker “LAB-LINE® Orbit Environ-Shaker” a 28°C durante 72 horas, hasta su completa autólisis (15).

Los 100 ml de las muestras se trasladaron a tubos nalgene, se adicionó 4 µl de 100 mM de PMSF (Fluoruro de fenilmetil sulfonilo), y 5 ml de agua destilada desionizada, se agitaron en vórtex por 10 segundos y se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 minutos. La centrifugación se repitió tres veces, lavando solo con agua destilada desionizada para eliminar los residuos del medio de cultivo. Seguidamente se adicionó a la muestra, 2936 µl de Carbonato de Sodio (CaCO₃), 60 µl de DTT (Ditiotreitol, reductor de di-sulfuros) y 4 µl de PMSF y se dejaron en shaker a 200 rpm a temperatura ambiente durante toda la noche, finalmente el sobrenadante se pasó a tubos eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min (4°C), para eliminar los residuos de Carbonato de Sodio (amortiguador que permite la solubilización de las proteínas totales), DDT y PMSF (17; 16). El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf nuevo y se guardó (4°C) para su posterior análisis.

-Cuantificación de Proteínas totales en los extractos crudos por técnica de Bradford: Para cuantificar las concentraciones de proteína total en los extractos

crudos de los aislamientos nativos, se realizó el procedimiento de cuantificación de proteína basado en una curva de albúmina sérica bovina (BSA). Las concentraciones empleadas para el control fueron de 100-1000 µgml⁻¹ de BSA, preparado seis diluciones. Para el análisis del extracto crudo se tomó 0,1 ml y se transfirieron a tubos de 16 x 100 mm según la metodología descrita por Bradford (1976).

Caracterización biológica

-Cría de *Tuta absoluta*: Las etapas en las que se desarrolló la cría fueron:

Obtención, siembra y trasplante de plantas: Las semillas de tomate variedad Milano tropic (Impulsemillas), se sembraron en bandejas con celdillas, de 15 cm de profundidad conteniendo turba (material orgánico) y se colocaron por 5 días en cuarto oscuro a una temperatura de 23-25°C, para acelerar la germinación. Posteriormente, se dejaron a temperatura ambiente en el semillero por tres semanas y después las plantas desarrolladas se trasplantaron a materas de 18 cm de alto.

Cría del insecto plaga *Tuta absoluta*: La cría de *T. absoluta* se realizó en jaulas de 80 cm de largo por 60 cm de ancho y 60 cm de profundidad, utilizando velo suizo. En la primera jaula se colocaron tres plantas de tomate con aproximadamente 60 adultos, así se aumentó la producción de huevos del insecto. Al siguiente día los huevos puestos por las hembras adultas, se pasaron a otra jaula, y a partir de este momento se contaron de 8-13 días para encontrar huevos maduros listos para eclosionar, obteniendo larvas de diferentes instares. Las plantas que contenían pupas fueron retiradas y colocadas en cámaras de emergencia para adultos. El procedimiento se repitió cíclicamente durante todo el experimento. Las condiciones de temperatura de las cámaras de cría variaban dependiendo de las condiciones climáticas externas.

Monitoreo de condiciones ambientales: Se llevó un registro de las condiciones ambientales (Temperatura y Humedad relativa).

Monitoreo sanitario de las plantas: Durante todo el período de los experimentos se monitoreo frecuentemente la presencia de otras plagas o enfermedades y se realizaron las limpiezas sanitarias pertinentes.

-Condiciones del bioensayo: Los experimentos se realizaron en condiciones controladas en cuarto de cría a

temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa $70 \pm 10\%$ y fotoperiodo 12 h L:O. La lectura del bioensayo se realizó diariamente contando el número de larvas vivas y muertas para cada uno de los tratamientos evaluados.

-Selección de Aislamientos nativos para la realización del Bioensayo: Los individuos del insecto plaga utilizado en el bioensayo fueron larvas de 2do instar de *Tuta absoluta*. De acuerdo a la metodología estandarizada se escogieron hojas de tomate fenológicamente iguales y se lavaron con agua, se secaron con papel absorbente, previo a los ensayos biológicos. Para la evaluación de los tratamientos se empleó un diseño completamente al azar (CA) con tres repeticiones. Cada repetición estaba constituida por una unidad experimental, que contenía 3 larvas de *Tuta absoluta* sobre 7 hojas de tomate iguales. En cada bioensayo se incluyó un testigo absoluto (hoja y larvas), un control positivo: hojas tratadas con la cepa de referencia (HD1) y tratamientos con bacilos nativos esporulados. En cada bioensayo se utilizó 3 unidades con 21 larvas por unidad experimental (triplicado) para un total de 63 larvas por tratamiento.

Los ensayos se realizaron comparando la actividad tóxica de los extractos crudos de bacilos nativos esporulados como factor de mortalidad sobre larvas de *T. absoluta*.

Inicialmente se realizaron bioensayos discriminatorios “Evaluación de bacilos nativos preseleccionados” con una concentración igual para todos los tratamientos (extracto crudo de cepas nativas esporuladas): $0,8 \mu\text{g/ml}$, a fin de identificar los bacilos nativos esporulados de mayor potencial patogénico sobre larvas de *Tuta absoluta*. La mortalidad corregida se determinó mediante la fórmula de Henderson y Tilton que permite cuantificar y corregir la mortalidad originada por el tratamiento con relación a la obtenida en el testigo. La mortalidad se evaluó cada 24 h, por 8 días. Se contó el número de larvas vivas y muertas (utilizando el criterio de larvas inmóviles o con cambio de color para calificarlas como muertas) y se determinó el porcentaje de mortalidad corregida de los bacilos nativos esporulados en cada bioensayo. Los conteos de mortalidad se realizaron utilizando un estereoscopio ADVANCED OPTICAL. La mortalidad corregida se sometió a un Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey.

-Determinación de la concentración letal 50 (CL_{50}): Para determinar la concentración letal 50, se partió de

una suspensión de extracto crudo de bacilos nativos esporulados con una concentración estándar para todos los bacilos a evaluar. A partir de esta concentración inicial alta, se realizaron 6 diluciones seriadas ($0,8 \mu\text{g/ml}$; $1,6 \mu\text{g/ml}$; $2,4 \mu\text{g/ml}$; $3,2 \mu\text{g/ml}$; $4 \mu\text{g/ml}$ y $4,8 \mu\text{g/ml}$), que se evaluaron como tratamientos. La mortalidad se registró como se indicó anteriormente. Para el análisis de regresión se utilizó la transformación PROBIT, utilizando el programa computacional Biostat 2007.

Por último, se llevó a cabo una prueba de confirmación, para determinar si la muerte de las larvas era producida o no por la acción de los bacilos nativos esporulados, o por efecto de la manipulación, o de otro agente patógeno externo. Esta prueba consistió en realizar un macerado de las larvas muertas de las diferentes dosis evaluadas, el macerado se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril y $100 \mu\text{l}$ de esta suspensión, se incubó en agar LB a 30°C por 24 horas, luego se determinó macroscópicamente la presencia de colonias de *B. thuringiensis*.

Conformación de un banco de Bacilos Nativos Esporulados

Una alícuota de $50 \mu\text{l}$ de un cultivo líquido de cada uno de los aislamientos nativos se utilizó para impregnar un tira de papel filtro previamente esterilizado dentro de una ampolleta color ámbar que inmediatamente después se selló al calor con un mechero, esto se realizó por triplicado para cada una de las cepas. Después, estas ampolletas se guardaron en el refrigerador a 4°C hasta su nueva utilización. El código asignado a cada ampolleta estuvo compuesto por la zona muestreada, que correspondía al departamento (ZC; zona Cundinamarca, ZB; zona Boyacá, ZH; zona Huila y ZS; zona Santander), seguido de las iniciales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL), y el número de la cepa (1). El cual variaba dependiendo del departamento y la cantidad de cepas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Aislamiento de cepas a partir de muestras de suelo en 4 departamentos de Colombia

Se recolectaron 28 muestras de suelo de 14 municipios de Colombia en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Huila y Santander. Se escogió como fuente de aislamientos de bacilos nativos esporulados muestras de suelo, debido a que este es uno de los lugares en donde se ha encontrado e identificado mayor cantidad de cepas de *B. thuringiensis* (18), ya que las esporas son arrastradas por el viento y el agua donde una vez enterradas conservan su viabilidad al estar protegidas de la radiación ultra violeta (16). Sin embargo, Schnepf y Whiteley (1985), argumentan que la amplia distribu-

ción de *B. thuringiensis* en el ambiente no solo se debe a factores abióticos, sino también a que los insectos que ingieren esporas de *B. thuringiensis* y mueren a causa de la infección, liberan al medio ambiente la forma vegetativa de estas bacterias que posteriormente esporulan y permanecen en este estado vegetativo hasta que pueda encontrar condiciones apropiadas para su multiplicación.

De las 28 muestras analizadas, se aislaron 99 aislamientos nativos, que presentaron colonias características del género *Bacillus* sp., las colonias presentaron color crema, borde irregular y redondeado.

La Tabla 1, presenta el número de aislamientos de bacilos nativos esporulados aislados a partir de las muestras de suelo analizadas de los diferentes municipios.

Tabla 1. Departamento, municipio y número de aislamientos nativos, a partir de las muestras de suelo analizadas.

Departamento	Municipio	Muestras Analizadas	Cepas de <i>Bacillus</i> sp. aisladas	Total
Cundinamarca	Chía	2	7	15
	Susa	2	8	
Boyacá	Raquirá	2	8	29
	Santa Sofía	2	8	
	Villa de Leyva	2	4	
	Sutamarchán	2	9	
Huila	Garzón	2	11	11
	Betulia	2	7	
	Mesa de los Santos	2	5	
Santander	Piedecuesta	2	10	44
	Lebrija	2	7	
	Girón	2	7	
	Rionegro	2	5	
	Floridablanca	2	3	
Total		28	99	99

Silvia (1999), reporta que las características del suelo son importantes y que no todos los microorganismos esporulados tienen los mismos requerimientos ambientales para llevar a cabo la transición del estado de esporulación a la fase vegetativa, lo que influye en la facilidad para recuperarlos. Así, por ejemplo, en los suelos francos arcillosos y arenosos, se dice que se encuentran la mayoría de bacilos esporulados, mientras que en los suelos de composición limo se encuentra en menor cantidad. No obstante, es necesario conocer las características físico químicas (pH, materia orgánica, textura entre otros) de los suelos y los factores climáticos de las zonas muestreadas para poder entender mejor que relación podría existir entre la presencia de estos microorganismos y el suelo del cual fueron aislados (19). Variable que en la presente investigación no fue estudiada.

Caracterización microscópica

La caracterización microscópica por tinción de Gram, confirmó la presencia de bacilos esporulados Gram positivos como característica de los aislamientos, lo cual indicó que estas posiblemente pertenecen al género *Bacillus* sp (20). La morfología observada de los bacilos esporulados fue variable, encontrando aislamientos con formas diferentes desde bacilos largos, cortos y con formación en cadena, su grosor también varió, indicando la diversidad de los aislamientos obtenidos. Por lo tanto, fue necesario visualizar la forma y número de cristales por campo óptico para cada uno de los 99 aislamientos. Esta característica es fundamental en la especie *Bacillus thuringiensis*. Para llevar a cabo este procedimiento, los 99 bacilos nativos esporulados se tiñeron con safranina-verde de malaquita, en donde las esporas se tiñen de verde y los cristales de rojo (11; 21). La cuantificación de cristales, se realizó evaluando tres campos ópticos bajo microscopía óptica, y según la clasificación realizada se encontró que en 50 (50%) bacilos nativos esporulados se presentaron entre 1 a 10 cristales por campo óptico. 10 (10%) de los bacilos nativos presentaron entre 10 a 20 cristales por campo óptico. Y únicamente un bacilo nativo esporulado presentó más de 20 cristales.

Además, se encontraron 38 (38%) bacilos nativos esporulados que presentaron las tres clasificaciones del conteo en los tres campos evaluados.

Por lo anterior, fue necesario agrupar los bacilos nativos esporulados de acuerdo a la forma del cristal observado en cada uno. Estableciendo 18 grupos o perfiles: I)

Amorfa; II) Amorfa, bipiramidal y redonda; III) Amorfa y cuadrada; IV) Amorfa y redonda; V) Amorfa, redonda y cuadrada; VI) Bipiramidal; VII) Bipiramidal y redonda; VIII) Bipiramidal y triangular; IX) Cuadrado; X) Cuadrado, bipiramidal y triangular; XI) Cuadrado, redondo y bipiramidal; XII) Cuadrado, redondo, bipiramidal y amorfo; XIII) Redondo; XIV) Redondo, amorfo y triangular; XV) Redondo, bipiramidal y triangular; XVI) Redondo y triangular; XVII) Triangular y XVIII) Triangular, amorfo y bipiramidal (Figura 1).

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, se puede concluir que los bacilos nativos esporulados, presentan diversidad en el ambiente, y esta diversidad de los cristales proteicos, se debe posiblemente a la capacidad de *B. thuringiensis* de llevar a cabo intercambio intra e interespecífico, de información genética mediante un proceso típico a nivel bacteriano llamado conjugación con lo que podrían intercambiar genes específicos que codifican para las proteínas *Cry* que son las que conforman los cristales paraesporales, los bacilos nativos esporulados utilizados en este estudio contienen entre 4 a 6 genes *cry* diferentes, lo que apoya esta idea (22).

Anteriormente, se relacionaba la forma del cristal presente en los aislamientos nativos con su actividad biológica potencial (6), de esta forma, los cristales redondos se han asociado con actividades insecticidas frente al orden díptero (23; 24), los cuadrados contra insectos dípteros y lepidópteros (25), las formas bipiramidales se han asociado con actividades en contra de insectos coleópteros y lepidópteros (26; 27). Sin embargo, Márquez *et al.* (1996), afirma que la correlación entre la forma del cristal y su actividad biológica frente a determinado tipo de insecto, no se cumple, debido a que la visualización del cristal depende del medio de cultivo en donde se cultivan las cepas.

Si se tienen en cuenta estas apreciaciones, en el presente estudio se presentaron bacilos con actividades potenciales frente a insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros, en una sola cepa que contenía cuatro formas de cristal, esto puede confirmarse con las caracterizaciones bioquímicas y moleculares y pruebas biológicas para encontrar si existe tal relación.

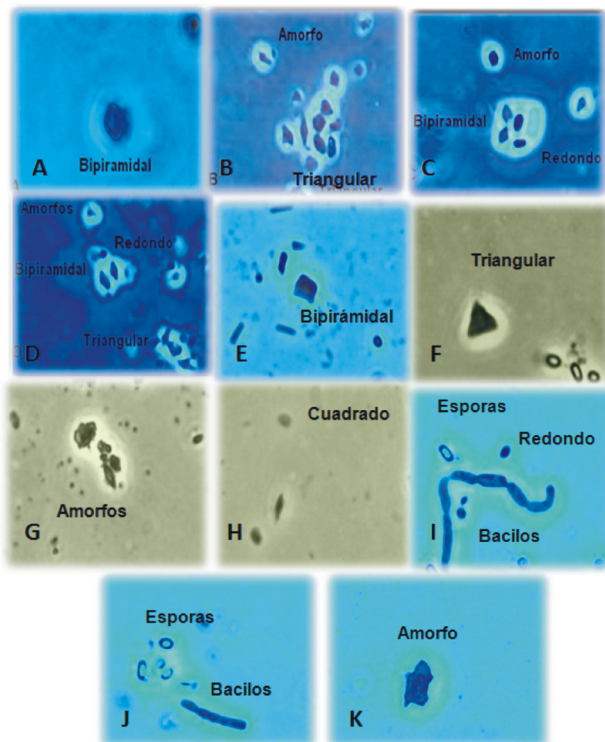


Figura 1. Aislamientos con una forma de cristal y se observan asociaciones de 2,3 y 4 formas de cristales en bacilos esporulados nativos.

Caracterización Bioquímica

Para la determinación del perfil electroforético de proteínas totales de los bacilos nativos esporulados, se empleó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Las proteínas Cry de *B. thuringiensis* pueden llegar a conformar hasta el 25% del peso seco de células esporuladas (28; 26), por lo tanto la técnica de SDS-PAGE de extractos crudos en fase estacionaria de crecimiento, permite establecer la presencia y abundancia relativa de las proteínas del cristal que son de gran importancia potencial, dada la alta variabilidad de proteínas insecticidas del cristal con actividad biológica diferentes (11).

Con el método empleado para la obtención de extractos crudos se aumento la esporulación en los bacilos nativos esporulados y con el siguiente tratamiento realizado al utilizar toda la biomasa y realizar tres lavados consecutivos para ser procesadas en un sonicador, se mejoró la solubilización de cristales y la lisis bacteriana, y por lo tanto, el revelado de bandas en los geles teñidos de los bacilos nativos esporulados. Este método fue estandarizado y escogido para caracterizar los 99 bacilos nativos

esporulados aislados.

En la Figura 2, se observa la presencia de bandas con pesos moleculares similares a la Proteínas Cry. Además al adicionar una proporción mayor del buffer de carga se aumentó la unión del SDS a la proteínas, aumentando de esta forma las cargas negativas en las proteínas, y por ende, mejoró el corrido electroforético de las proteínas, resultado que directamente influye en el revelado de estas (29).

-Electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos crudos de los bacilos nativos esporulados:

En la Figura 2, se observan las proteínas totales reveladas a partir de los bacilos nativos esporulados. En el carril 4 se pueden ver dos bandas bastantes gruesas, parecidas a las bandas que revela la cepa de referencia HD1 (carril 2), que revela la proteína Cry1 y Cry2 en 135 y 70 kDa respectivamente. En todos los carriles de la Figura 2 se revelan bandas de proteínas de bajo peso molecular. Por medio de la caracterización bioquímica de los 99 bacilos nativos esporulados evaluados, se encontró que las proteínas totales visualizadas en los geles

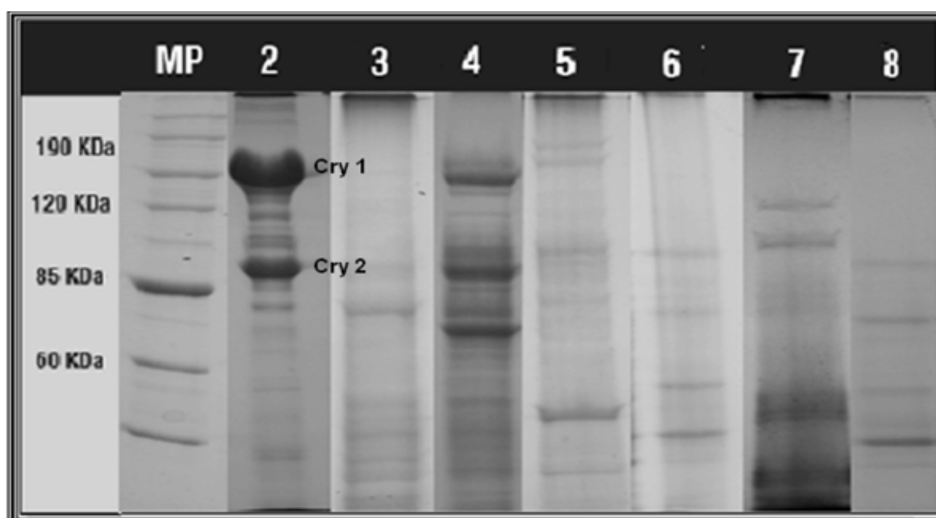


Figura 2. Perfil electroforético de proteínas SDS-PAGE en cepas de referencia *Bt var. kurstaki* HD1, y algunos bacilos nativos esporulados. Carril 2) *Bt var. kurstaki* HD1; carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8) bacilos nativos esporulados; MP) Marcador de peso molecular Proteínas BROAD RANGE.

de poliacrilamida, presentaron pesos que varían entre 28-150 kDa, por lo tanto, se realizó una clasificación en siete (7) grupos de acuerdo a su posible actividad biológica sobre insectos plaga (30), tomando como base que las proteínas Cry representan entre el 25 al 30% de proteína total (28; 26), esta clasificación se estableció de la siguiente forma:

El grupo I, constituido por bandas electroforéticas de proteínas cuyo peso molecular varía entre 10-20 kDa, peso no asociado a ninguna proteínas Cry conocida. El grupo II, con bandas electroforéticas de proteínas con pesos moleculares de 25-30 kDa, asociado a proteínas Cyt (Proteínas Citolíticas), con actividad frente a insectos lepidópteros y dípteros (31). El grupo III, con bandas proteicas de pesos moleculares de 35-50 kDa, asociado a proteínas Cry1, Cry3, Cry6, Cry34, Cry35 y Cyt1A con actividad biológica frente a insectos lepidópteros, coleópteros, himenópteros y a organismos como nematodos y ácaros (32; 33). El grupo IV, con bandas electroforéticas de pesos moleculares de 60-75 kDa, asociado a proteínas Cry2 y Cry3, con actividad biológica dual frente a insectos lepidópteros dípteros y coleópteros respectivamente (33; 34). El grupo V, con bandas electroforéticas de proteínas de pesos moleculares de 80-85 kDa, asociado a proteínas Cry1Ia, con actividad biológica frente a insectos lepidópteros y dípteros (34). El grupo VI, con bandas electroforéticas de pro-

teínas de pesos moleculares de 100-150 kDa, asociado con proteínas Cry1, Cry32Aa, con actividad biológica frente a insectos lepidópteros y actividad dual frente a coleópteros (6) y del tipo Cry4 con actividad frente a dípteros (32; 33). El grupo VII constituido para aquellos bacilos nativos esporulados que no revelaron bandas de proteínas.

Con la determinación de los perfiles electroforéticos de proteínas se puede evidenciar la diversidad de aislamientos nativos (16), y esta comparación de bandas proteicas permite identificar una posterior relación con su actividad biológica.

También se encontraron bacilos nativos esporulados, que revelaron una proteína a su patrón electroforético o que revelaron más de una proteína a su patrón electroforético. Por lo tanto, fue necesario realizar una clasificación en donde se agruparan individualmente cada proteína o grupo de proteínas con los respectivos bacilos nativos y con el grupo que presento su posible actividad biológica, para esta clasificación solo se tuvieron en cuenta las proteínas prominentes. En la Tabla 2 se identifican los 28 grupos encontrados.

Esta diversidad de proteínas presentes en los 99 bacilos nativos esporulados, puede ser coherente si se tiene en cuenta, que existen muchas cepas de *B. thuringien-*

sis que producen inclusiones cristalinas que contienen mezclas de delta-endotoxinas. Por ejemplo, Bt var. *kurstaki* HD1 contiene 3, Cry1 (130-140 Kda) y 2 Cry2 (70 Kda) en el mismo cristal proteico (35). Bt var *israeliensis* presentan genes que codifican para las proteínas Cry4, Cry11 y Cyt1A, en el mismo cristal proteico (11) (Tabla 2).

La presencia de los bacilos nativos esporulados, y su clasificación con el perfil electroforético de proteínas, también fue independiente del lugar de origen, ya que se encontraron bacilos nativos esporulados con más de un grupo de clasificación en las distintas regiones muestreadas.

Ellis *et al.* (2002), Porcar y Juárez (2003), afirman que las proteínas de bajo peso molecular en donde se clasifican la mayoría de los aislamientos (Tabla 2), pueden ser un grupo único debido a su actividad sinérgica, ya que el sinergismo brinda la actividad antagónica de las delta endotoxinas, en algunas especies de insectos, y puede ser un criterio para seleccionar las cepas que pueden controlar al insecto lepidóptero *Tuta absoluta*, y otro tipo de plagas que pueden afectar los cultivos agrícolas.

Tabla 2. Relación entre los pesos moleculares de las proteínas reveladas en cada uno de los bacilos nativos esporulados y el/o los grupos de actividad biológica establecidos.

Perfil electroforético de Proteínas (Bandas en kDa)	Número de Bacilos nativos esporulados	Grupo ¹ con posible actividad biológica
28	5	II
35	3	III
50	5	III
75	1	IV
130	1	VI
10;20	1	I
10;75	1	I,IV
28;35;50	12	II,III
28;35;50;100;150	1	II,III,VI
28;35;50;75; 100	6	II,III,IV
28;35;50;85	1	II,III,V
28;35;75	2	II,III,IV
28;35;85	1	II,III,V
28;50	4	II,III
28;50;75	1	II,III,IV
28;75	4	II,IV
28;75;100	1	II,IV,VI
28;80	2	II,V
35;50;75	24	III, IV
35;50;100;150	2	III,VI
35;50;75;100;150	4	III,IV,VI
35;50;75;85	1	III,IV,V
35;75	2	III,IV
35;85	2	III,V
50;75;100	1	III,IV,VI
75;100	2	IV,VI
75;100;150	1	IV,VI
NP	8	VII

Caracterización Molecular

-Extracción de ADN: Los genes que codifican para las proteínas Cry son generalmente de origen plasmídico, sin embargo algunas investigaciones, han encontrado estos genes en el ADN total bacteriano (5). En el presente estudio, se obtuvo ADN general y plasmídico de los 99 bacilos nativos esporulados. Se observaron bandas de ADN de alto peso molecular visibles en gel de

agarosa al 1% (Figura 3). El ADN total bacteriano se diferencia del ADN plasmídico porque posee mayor peso molecular, y por lo tanto, presenta menor velocidad de migración en el gel de agarosa (Figura 3 a) (36). La calidad del ADN es un factor determinante para obtener buenos resultados cuando se llevan a cabo las reacciones de amplificación por PCR (37).

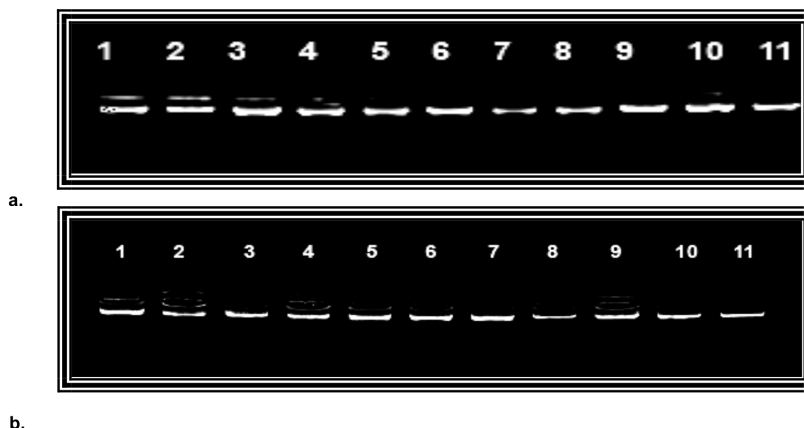


Figura 3. a) ADN general de bacilos nativos esporulados (1-11), con el método Kit ULTRA CLEAMTMMicrobial isolation Kit b. ADN plasmídico. Bacilos nativos esporulados (1-11), con el método Kit ULTRA CLEAMTMMicrobial isolation Kit. Gel de agarosa al 1% teñida en bromuro de etidio.

Amplificación de genes *cry1* en bacilos nativos esporulados

Se caracterizaron 99 bacilos nativos esporulados a través de la mezcla del ADN genómico y plasmídico (0,5 µl de cada uno) (Figura 4), con la mezcla se busco que los genes que no se encuentran el ADN genómico se presenten, en el ADN plasmídico, debido a que Schnepf *et al.* (1998) sugieren que la mayoría de los genes *cry1* se encuentran en el plásmido y Porcar y Juárez-Pérez (2004), que se encuentran en el ADN total bacteriano. No obstante, se identificaron 35 bacilos nativos esporulados con presencia del gen *cry1* (Tabla 3). En la Figura 4 se observan bandas con pesos moleculares que varían entre 543 y 594 pb.

En el presente estudio, en los 99 bacilos nativos esporulados aislados el 35,4% presentaron genes pertenecientes a la familia de genes *cry1*. Resultado similar a lo observado por Ben-Dov *et al.* (1996) en un estudio realizado en Israel, Kazakihstan y Uzbekistan donde reportaron la presencia de genes *cry1* en un 33,5% de 215 aislamientos. En países como Filipinas y Nueva Zelan-

da los aislamientos de suelos positivos para la presencia de genes *cry1* se encuentran entre un 24-45% (38; 39). Sin embargo, en diferentes lugares del mundo como Taiwan, China y Mexico. En donde se ha reportado con detalle la caracterización en términos del contenido de genes *cry* (40; 13; 41; 42; 43). En Taiwán, encontraron que de 225 aislamientos analizados el 98,2%, contenían genes de la familia *cry1* (41); Gao *et al.* (2008), en China, al analizar 570 aislamientos encontraron un porcentaje del 46,5%, de aislamientos que presentaron genes de la familia *cry1*. Bravo *et al.* (1998), en México, reportaron en 246 aislamientos analizados que el 49,6% presentaban genes *cry1*. Lo que sugiere que posiblemente en los 99 bacilos nativos esporulados aislados en el presente estudio presenten genes diferentes a la familia *cry1*.

En la tabla 3 se presenta el número y porcentaje de bacilos nativos esporulados, que presentaron fragmentos amplificados de genes *cry1* en cada uno de los municipios en donde se realizó el muestreo.

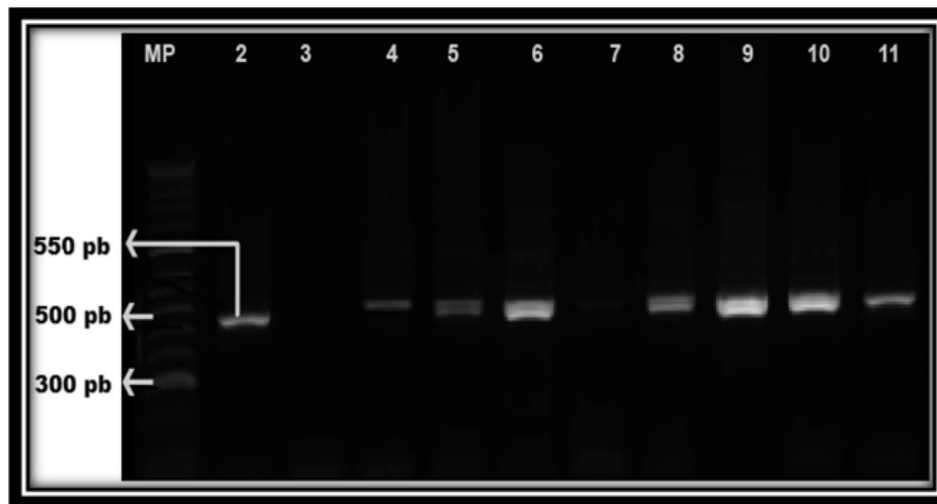


Figura 4. Amplificación de fragmentos por PCR de genes *cry1* utilizando los oligonucleótidos universales Bravo *et al.* (1998). 2) *Bt* var. *kurstaki* HD1; 3) Control Negativo; carril 4-11 bacilos nativos esporulados 4,11, 24, 39, 57, 75, 76, 77; MP) Marcador de peso molecular Hypper Ladder II; Gel de Agarosa al 1% teñido en Bromuro de Etídio.

Tabla 3. Porcentaje de cepas con presencia del gen *cry1* por municipio en cada departamento.

Departamento	Municipio	Número de Bacilos nativos esporulados aislados	Número de bacilos que amplifican genes <i>cry1</i>	%
Cundinamarca	Chía	7	3	8,5
	Susa	8	5	14,3
	Raquirá	8	2	5,7
Boyacá	Santa Sofía	8	2	5,7
	Villa de Leyva	4	3	8,6
	Sutamarchán	9	2	5,7
Huila	Garzón	11	1	2,9
	Betulia	7	3	8,6
	Mesa de los Santos	5	4	11,4
Santander	Piedecuesta	10	6	17,1
	Lebrija	7	1	2,9
	Girón	7	1	2,9
	Rionegro	5	1	2,9
	Floridablanca	3	1	2,9
	Total	99	35	100

Amplificación de genes *cry1* específicos en bacilos nativos esporulados.

Los 35 bacilos nativos esporulados que se caracterizaron a través del ADN genómico y plasmídico, los cuales previamente habían amplificado fragmentos de genes *cry1*, fueron analizados en dos rondas de PCR múltiple (M-PCR).

En la primera reacción, mezcla A se amplificaron bandas en los diferentes bacilos nativos esporulados con pesos moleculares de 246, 216 y 180 pb aproximados,

que pertenecen a los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* (Mezcla A), indicando la diversidad de estos genes, además se observa, en todos los carriles que el fragmento de 246 pb que identifica el gen *cry1Aa* es el de mayor presencia en los aislamientos y el gen *cry1Ac* de 180 pb se presenta en menor número de bacilos nativos esporulados evaluados (Figura 5), adicionalmente, la banda inespecíficas de 517 pb que se presentan, también estuvo presente en el estudio realizado por Cerón *et al.* (1994), quienes diseñaron los oligonucleótidos para esta reacción.

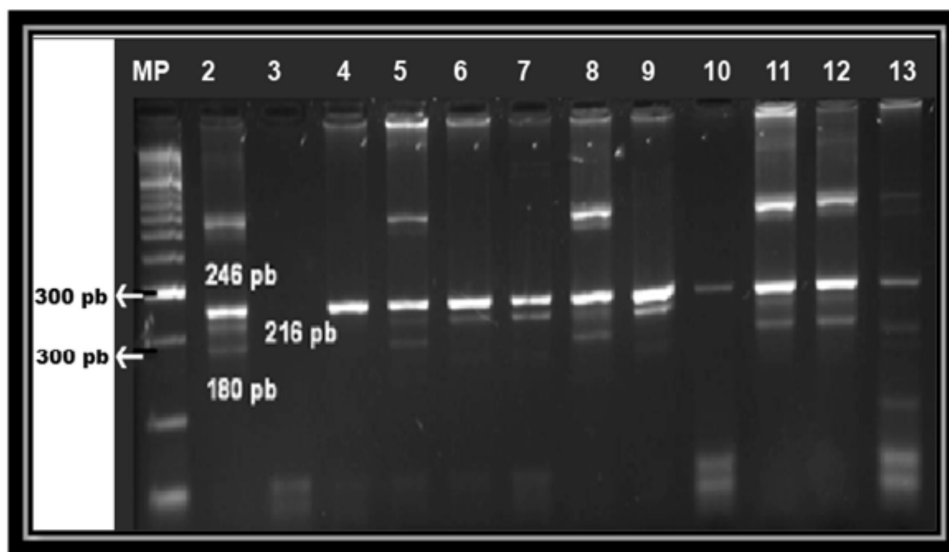


Figura 5. Productos de la amplificación por PCR de genes específicos *cry1* en cepas de referencia y cepas nativas, utilizando la mezcla A de oligonucleótidos. *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* con pesos moleculares en pb de 246, 216 y 180 pb. Carril 2) Bt var *kurstaki* HD1; Carril 3) Control negativo; Carril 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) bacilos nativos esporulados 4, 9, 11, 14, 24, 57, 61, 75, 76 y. MP) Marcador de peso molecular Hyper Ladder II. Gel de Agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.

Con la segunda reacción, mezcla B, se identificaron bandas con pesos moleculares de 367, 130 y 290 pb, pertenecientes a los genes *cry1B*, *cry1C* y *cry1D*, también se identifica la gran diversidad de estos genes en

los bacilos nativos esporulados evaluados, identificando el gen *cry1C* en el fragmento de 130 pb en la mayoría de bacilos nativos esporulados evaluados (Figura 6).

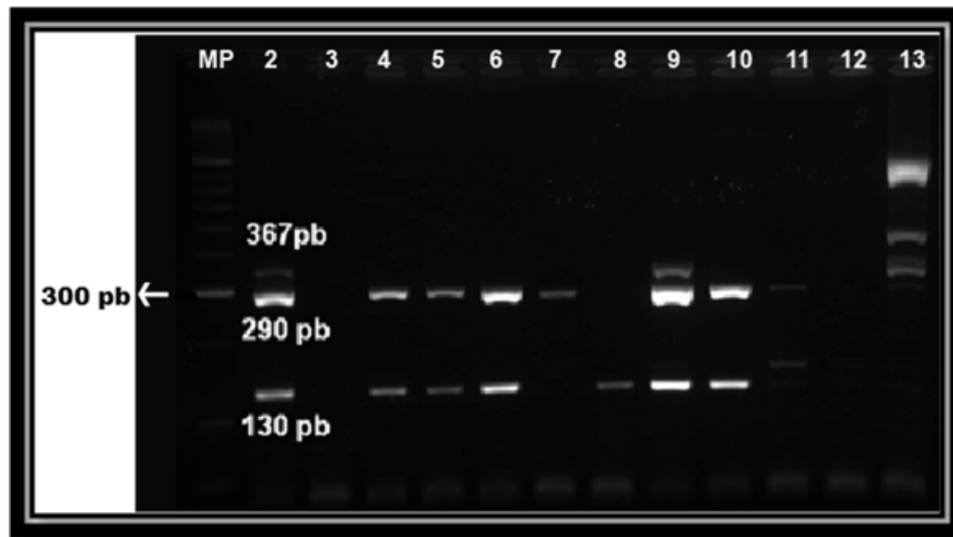


Figura 6. Productos de la amplificación por PCR de genes específicos *cry1* en cepas de referencia y cepas nativas, utilizando la mezcla B de oligonucleótidos. *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da* con pesos moleculares en pb de 367, 130 y 290 pb. Carril 2) Bt var aizawai HD137; 3) Control negativo; Carril 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) bacilos nativos esporulados 11, 14, 24, 49, 61, 75, 76, 77 y 86; MP) Marcador de peso molecular Hyper Ladder II. Gel de Agarosa al 3% teñido en bromuro de etidio.

Adicionalmente, se encontró, que de los 35 bacilos nativos esporulados, 29 bacilos presentaron diferentes perfiles de genes, observando aislamientos desde 1 hasta 5 genes *cry1* específicos, por lo que fue necesario realizar agrupaciones encontrando los siguientes grupos de genes *cry1* específicos: I) *cry1Aa*; II) *cry1Aa*, Ab, Ac, B; III) *cry1Aa*, Ab, Ac, B, Ca; IV) *cry1Aa*, Ab, Ac, C; V) *cry1Aa*, Ab, B, C; VI) *cry1Aa*, Ab, B, D; VII) *cry1Aa*, Ac, B, C; VIII) *cry1Aa*, Ac, C, D; IX) *cry1Aa*, B; X) *cry1Aa*, C; XI) *cry1Aa*, C, D; XII) *cry1Ab*; XIII) *cry1C*; XIV) bacilos nativos esporulados que amplificaron *cry1*, pero no la mezcla de oligonucleótidos realizada (NA).

Además, la presencia de los bacilos nativos esporulados, y su clasificación con el perfil de genes encontrados, también fue independiente del lugar de origen, ya que se encontraron bacilos nativos esporulados con más

de un grupo de clasificación en las distintas regiones muestreadas (Tabla 4).

Los genes más ampliamente distribuidos son los genes *cry1*, los cuales presentan actividad contra insectos lepidópteros (41). En el presente estudio, se encontró que los genes ampliamente distribuidos en los bacilos nativos esporulados analizados son los genes *cry1Aa* con un 76%, seguido del gen *cry1B* con un 35%, *cry1C* con un 32%, *cry1Ab* con un 26%, *cry1Ac* con un 21% y *cry1D* con un 8,8%. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Chack *et al.* (1994), quienes encontraron en 225 aislamientos nativos evaluados, la presencia de genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* en un 56,4%. En México Bravo *et al.* (1998) encontraron en 496 aislamientos evaluados, la presencia de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* en un 19,7%.

Tabla 4. Perfil de genes *cry1* específicos identificados en bacilos nativos esporulados en cada uno de los municipios muestreados

MUNICIPIO	Amplificación de genes <i>cry1</i>	Amplificación de genes <i>cry1</i> específicos	Perfil de genes <i>cry1</i> específicos
Chía	3	1	1Aa
Susa	5	4	1Aa, 1Ab, 1Ac, 1Ba, 1Ca
Raquira	2	2	1Aa, 1Ba
Santa Sofía	2	1	1Aa, 1Ab, 1Ac, 1Ba, 1Ca
Villa de Leyva	3	2	1Aa, 1Ab.
Sutamarchán	2	1	1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca
Garzón	1	1	1Aa
Betulia	3	3	1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Da
Mesa de los Santos	4	4	1Aa
Piedecuesta	6	6	1Aa, 1Ab, 1Ac, 1Ba, 1Ca, 1Da
Lebrija	1	1	1Aa, 1Ab, 1Ac, 1Ca
Girón	1	1	1Aa, 1Ca, 1Da
Rionegro	1	1	1Ca
Floridablanca	1	1	Aa
Total	35	29	

Selección de bacilos nativos para el montaje de bioensayos contra *Tuta absoluta*

La relación entre la caracterización microscópica, bioquímica y molecular pueden ser complementarios, debido a que son herramientas que permiten identificar si los aislamientos obtenidos de distintas fuentes de recolección, pertenecen a *B. thuringiensis* y pueden presentar actividad biológica frente a una plaga determinada. Por ejemplo, la forma de los cristales de las diversas cepas de *B. thuringiensis* ha sido relacionadas con su actividad biológica, aunque esta últimamente ha sido cuestionada (44), sin embargo, en la caracterización bioquímica, y de acuerdo con el perfil electroforético que presente, se puede determinar si los cristales observados tienen la presencia de pesos similares a las proteínas Cry, que se pueden clasificar con posible actividad frente a un orden de insecto, y por último la caracterización molecular que indica la probabilidad de que los genes *cry* que se identifiquen mediante la prueba de PCR se estén expresando activamente en una cepa determinada (11).

Para la selección de los bacilos nativos esporulados a evaluar biológicamente se tuvo en cuenta el número de cristales, que tuvieran en los conteos entre 10-20 y más de 20 cristales por campo óptico. Esta característica es muy importante porque los cristales están compuestos

por las proteínas Cry, y son estas, las que desarrollan en principio la toxicidad que se aumenta con la entrada de esporas al hemocele de la larva. El número y peso de proteínas, ya que las toxinas Cry1 están relacionadas con pesos de 130-135 kDa y las toxinas Cry2, también activas contra insectos lepidópteros, poseen pesos entre 60-70 kDa. Y por último el número y tipo de genes *cry1* presentes. Los bacilos nativos seleccionados (Tabla 13), presentan 2 o más formas de cristal, eligiendo preferencialmente la forma redonda y/o bipiramidal (ocho bacilos), que según la literatura presenta actividad frente al orden lepidóptera, además de otras formas de cristal como redondas, amorfas y triangulares para relacionar la posible actividad insecticida y las formas de cristal potenciales para el control de *Tuta absoluta*.

Se seleccionaron bacilos que por su perfil electroforético hubieran revelado entre 2 a 5 proteínas clasificadas en grupos con actividades potenciales contra insectos lepidópteros y que estuvieran relacionadas por peso, con las proteínas Cry de las cepas de referencia Bt var. *kurstaki* y Bt var. *aizawai*, que en los ensayos preliminares mostraron alta toxicidad contra larvas de la polilla del tomate. Cuatro aislamientos revelaron 5 bandas de proteínas, dos revelaron cuatro, uno reveló tres y por último tres revelaron únicamente 2 bandas de proteína (Tabla 13).

La caracterización molecular mediante PCR, permitió seleccionar aislamientos que contenían entre 4 a 5 genes *cry1*. Seis aislamientos presentaron el gen *cry1C* que de acuerdo a investigaciones previas es el gen que codifica una toxina Cry activa biológicamente a esta plaga, además de otras combinaciones de genes (45) (Tabla 13). Los genes más presentes en todas las cepas fueron el gen *cry1Aa* (en nueve de los aislamientos), el *cry1Ab* (en seis aislamientos) y los genes *cry1Ac* y *cry1B* (en cinco aislamientos). En total se seleccionaron 9 perfiles de genes diferentes que podrían mostrar la respuesta biológica, de cómo están actuando las toxinas codificadas contra larvas de 2do instar de *Tuta absoluta*.

De acuerdo al criterio anterior, se seleccionaron 10 bacilos nativos esporulados (ZCUJTL9, ZCUJTL11, ZBUJTL24, ZBUJTL39, ZSUJTL57, ZSUJTL75, ZSUJTL76, ZSUJTL77, ZSUJTL86 y ZSUJTL96) con el fin de identificar su posible actividad frente al insecto plaga del tomate *T. absoluta*.

Obtención y cuantificación de proteínas totales de los extractos crudos.

Para obtener la mayor producción de esporas y cristales en los 10 bacilos nativos esporulados seleccionados, se realizó el procedimiento descrito por Ramos *et al.* (2004). Se empleó el medio de cultivo, leche peptonizada modificada, en el que los bacilos nativos esporulados obtienen con la triptona y dextrosa, los requerimientos de carbono y energía necesarios para su crecimiento, con el extracto de levadura, los aminoácidos esencia-

les, para su desarrollo y esporulación (46). Las sales $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4$ permiten aumentar la producción de las δ -endotoxinas (16), que con la agitación a 340 rpm a 28°C durante 72 horas facilitó la autólisis de la célula, liberando las esporas y los cristales en gran cantidad (15), que finalmente se cuantificaron en una curva de albúmina de suero bovino (47) (Anexo 5). La ecuación de la recta para esta regresión fue “ $y=0.0008x - 0.0052$ ” y el coeficiente de correlación (R2) para esta ecuación fue 0.99.

Con esta curva se correlacionó las lecturas de absorbancia a 595 nm registradas para las distintas concentraciones de proteína total de los bacilos nativos seleccionados y la cepa de referencia Bt var *kurstaki* HD1.

Caracterización Biológica

Tuta absoluta posee un alto potencial reproductivo, produciendo entre 10-12 generaciones por año. El ciclo biológico se completa en 29-38 días dependiendo de las condiciones ambientales. El desarrollo se da hasta en 76 días a 14°C, 39 a 19,7°C y 23 a 27,1°C (48). Observaciones en campo coinciden con estas descripciones, sin embargo, las jaulas mantenidas en el CIAA están sometidas a temperaturas variables, altas durante el día y muy bajas durante la noche, condición que prolonga el desarrollo de las larvas, llegando a estar entre 50-60 días.

-Bioensayos discriminatorios para la evaluación de bacilos nativos esporulados preseleccionados.

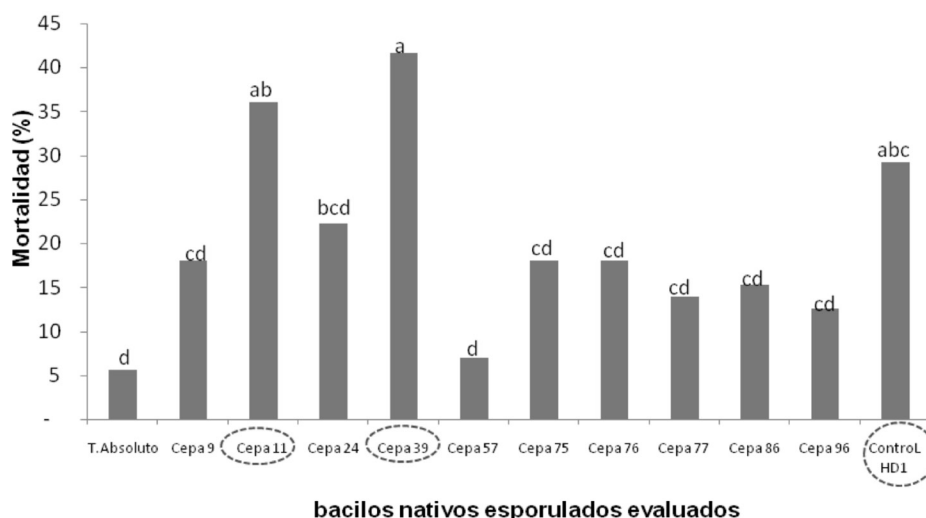


Figura 7. Mortalidad de las larvas de *Tuta absoluta* tratadas con los diferentes extractos crudos de los bacilos nativos esporulados, prueba de Tukey 95% de confianza. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas

La concentración utilizada para este bioensayo fue 0.8 µg proteína total/ml, dosis de referencia, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Pitre *et al.* (2008), quien determinó la CL_{50} para la cepa de referencia Bt var. *kurstaki* HD1 con un valor de 0.846 µg de proteína/cm² sobre larvas de primer instar de *Tecia solanivora*, insecto lepidóptero.

La evaluación de los bacilos nativos seleccionados mostró un incremento en la mortalidad de las larvas de *Tuta absoluta* a medida que aumentaban los días después de la aplicación (DDA) del extracto crudo. La mayor mortalidad de larvas después de 6 DDA, se obtuvo con el bacilo nativo esporulado ZBUJTL39, con un porcentaje de mortalidad del 42,7%, seguido del bacilo nativo esporulado ZCUJTL11, que presentó una mortalidad de 36,33% y el bacilo nativo esporulado ZBUJTL24 con un porcentaje de mortalidad de 23,78%. Con la cepa utilizada como control positivo HD1 (cepa regenerada desde el producto comercial Dipel) se presentó una mortalidad de 29,39% (Figura 7). En el tratamiento testigo se evidenció una mortalidad de las larvas de 6,94%, lo que indica que la mortalidad de los tratamientos correspondientes a los diferentes bacilos nativos esporulados, se debe probablemente a la aplicación del extracto crudo de los aislamientos evaluados en el presente bioensayo, debido a que, un porcentaje mayor del 10% de mortalidad en el testigo absoluto en bioensayos con insectos del orden lepidóptera, es un criterio para invalidar la prueba (49).

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede sugerir que la actividad biocontroladora que presenta el bacilo nativo esporulado ZBUJTL39 es mayor a la presentada por la cepa de referencia (HD1). Lo anterior, posiblemente se debe a que este microorganismo presenta mayor afinidad por este insecto (*Tuta absoluta*), además de estar mejor adaptado a las condiciones medioambientales de nuestro país. El bacilo nativo esporulado

ZCUJTL11, también presentó porcentajes de mortalidad superiores a la cepa de referencia, no obstante, en la prueba de comparación de Tukey no presentó diferencias significativas con HD1 (Figura 7), lo que sugirió la realización de ensayos de concentración letal 50, para determinar el verdadero potencial que presentan estos bacilos nativos esporulados sobre el control de *Tuta absoluta*.

Con los resultados preliminares obtenidos se seleccionaron los bacilos nativos esporulados ZCUJTL11 y ZBUJTL39, para ser utilizados en la determinación de la concentración letal 50, debido a que presentaron mortalidades significativamente superiores a la cepa de referencia HD1 y a los demás bacilos nativos esporulados, además de presentar un alto potencial para su utilización en el control de la plaga.

Concentración Letal 50 (CL_{50})

Se utilizó como dosis de referencia el valor utilizado en la evaluación de las cepas preseleccionadas, el cual fue de 0,8 µg/ml, debido a que a esta concentración no se obtuvieron mortalidades del 100%. A partir de este dosis se manejaron intervalos de 0,8 unidades hasta la concentración 4,8 µg/ml. El bioensayo contó con un testigo absoluto y el control positivo correspondiente a la cepa de Bt var. *kurstaki* HD1.

Los resultados de mortalidad obtenidos con las diferentes dosis de los bacilos nativos esporulados evaluados fueron sometidos a un análisis Probit con el programa Bioestat 2007. Para todos los bacilos nativos esporulados evaluados, el valor de P fue mayor a 0.05, lo que permite aceptar la hipótesis propuesta, que sugiere que existe una correlación lineal entre la dosis y la respuesta evaluada, correspondiente a la mortalidad de las larvas (Figura 8) (Tabla 5).

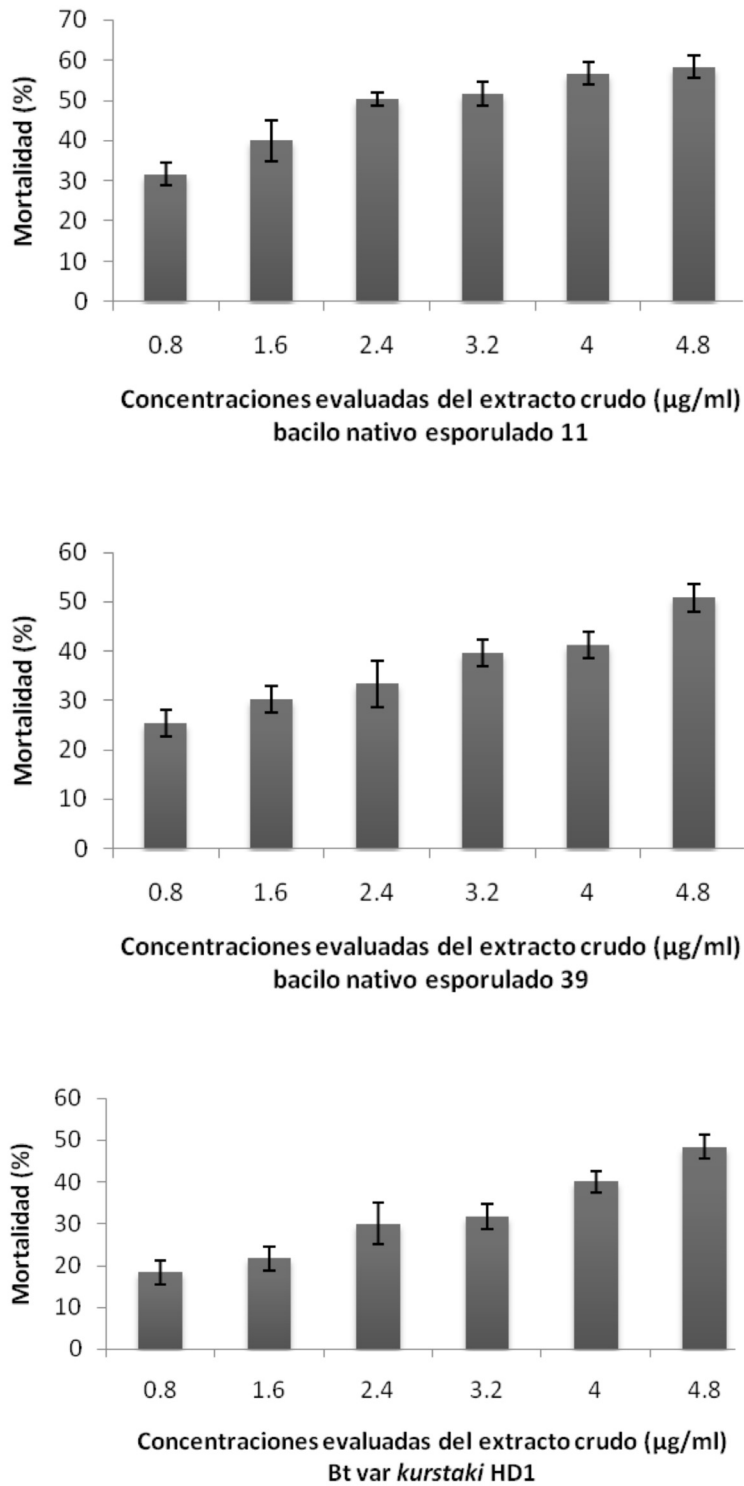


Figura 8. Mortalidades obtenidas en la evaluación dosis- respuesta de los bacilos nativos esporulados sobre larvas de *T. absoluta*. a. bacilo nativo 11. b. bacilo nativo 39. c. Cepa de referencia HD1.

Tabla 5. Concentraciones letales 50 (CL₅₀) de las cepas nativas y de referencia. Cepa 11, Cepa 39 y Bt var. *kurstaki* HD1, sobre larvas de 2^{do} instar de *Tuta absoluta*, con límites de confianza al 95%

Cepas	Concentración µg/ml	Límite inferior µg/ml	Límite Superior µg/ml
Cepa 11	2,40	1,585	3,628
Cepa 39	5,53	3,869	13,238
Bt var. <i>kurstaki</i> HD1	6,41	3,922	12,759

En el presente estudio se identificaron insectos con coloraciones grises oscuras y negras, ubicadas en la parte media del intestino y en los últimos segmentos del cuerpo, sintomatología que produce los aislamientos de *B. thuringiensis* (Figura 9). Este resultado se corroboró con la prueba de efectividad donde se observaron colonias típicas de los bacilos nativos esporulados evaluados, y se estableció que la muerte de las larvas no fue producida por un efecto de la manipulación, agente antimicrobiano o algún microorganismo externo.

Esta coloración es ocasionada por los tejidos necrosados debido al incremento de la actividad secretora de las células del epitelio intestinal, daño mecánico a la ruptura de las células epiteliales, al deterioro de las células columnares y basales, y a la posterior separación de estas de las células y microvellos intestinales e invasión de los fluidos intestinales en la hemolinfa y flacidez corporal (50).



Figura 9. Larva de *Tuta absoluta* muerta debido a intoxicación con el complejo espóra-cristal (extracto crudo).

La identificación del bacilo nativo ZCUJTL11 es de gran importancia para el cultivo del tomate en Colombia, ya que abre la posibilidad del control biológico de *Tuta absoluta*, apoyando las acciones integradas de MIP para este lepidóptero plaga. El estudio para la producción de un biopesticida basado en este bacilo debe hacerse con miras a brindarle una posible solución a la comunidad de campesinos y agricultores que viven de este cultivo tan importante para el País. Las características sobresalientes de este bacilo que presentó cristales bipiramidales y romboidales, iguales a los producidos por la cepa de referencia Bt variedad *kurstaki* HD1. Produjo tres bandas de proteínas sobresalientes con pesos de 35, 50 y 75 kDa. La proteína de 75 kDa puede estar relacionada con toxicidad hacia insectos lepidópteros plaga, ya que las protoxinas de 125-135 kDa se clivan en proteínas tóxicas activas de 60 a 80 kDa. Los genes *cry* identificados en este bacilo fueron *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba* y *cry1Ca*, al parecer el gen *cry1Ab* está relacionado con toxicidad sobre larvas de *Tuta absoluta*. En un trabajo previo Theodoluz *et al.* (2003) evaluando proteínas Cry1Ab recombinantes observó DL₅₀ entre 10 y 18,2 µg/ml, lo que confirma el potencial biocontrolador del aislamiento ZCUJTL11 con el que se obtuvo una DL₅₀ de 2,4 µg/ml de extracto crudo de proteínas totales. Es de anotar que si el bioensayo se realiza con proteínas recombinantes de este aislamiento nativo la DL₅₀ estaría muy por debajo de este valor obtenido.

Adicionalmente se conformó un banco de cepas de Bacilos esporulados, la cual se encuentra almacenada en la Universidad Jorge Tadeo Lozano. El banco de cepas se registró como bacilos Gram positivos esporulados debido a que es necesario establecer si son o no son aislamientos de *Bacillus thuringiensis*. Para lo anterior se sugiere realizar la prueba del antígeno flagelar (H) o una PCR en tiempo real con el fin de establecer correctamente su especie.

Conclusiones

-La caracterización microscópica de aislamientos de *B. thuringiensis*, por medio de tinciones diferenciales, como la safranina y el verde de malaquita, permiten reconocer la forma, tamaño y cantidad relativa de esporas y cristales, identificando las diferentes morfologías de cristal.

-Al parecer, la forma del cristal es dependiente del medio de cultivo en el que se cultive los bacilos, y además, es independiente de su actividad biológica frente a un insecto plaga.

-La metodología SDS PAGE permite identificar bandas de proteínas con pesos moleculares similares a las pro-

teínas Cry a partir de extractos crudos de aislamientos nativos, y con esto, predecir la actividad biológica potencial de acuerdo a grupos establecidos.

-La amplificación por PCR con la utilización de oligonucleótidos universales diseñados en zonas de alta homología de los genes, permitió la identificación de genes de la familia *cry1* en aislamientos nativos esporulados.

-La amplificación por PCR múltiple utilizando oligonucleótidos específicos diseñados en zonas hipervariables de los genes permitió la identificación de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da* en aislamientos nativos esporulados.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Vis, R.; Fuentes, L.; Escobar, H.; Lee, R. 2001. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades En: Producción de Tomate bajo Invernadero. Capítulo 5. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, CIAA, Colciencias. Bogotá. p. 59-90.
2. Cely, L.; Cantor, F.; Rodríguez, D.; Cure, J. 2006. Niveles de daños ocasionados por diferentes densidades de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) en tomate bajo invernadero. Resúmenes Socolen Reencuentro con la Entomología en el Eje Cafetero. XXXIII. Manizales 26, 27 y 28 de julio. Congreso de Entomología.
3. García, F. 1993. Control biológico de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) plaga del tomate. En: Palacios, F., Arciniegas, I. Astrudillo; A.M. (eds.). Control Biológico en Colombia, Historias, Avances y Proyecciones. Lito-Támara Ltda, Palmira, Valle del Cauca (Colombia), 92-94.
4. Feiltenson, J.S.; Payne, J.; Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond Biotechnology. 10:271-275.
5. Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Fean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology Molecular Biology Review 62: 775-806.
6. Hofte, H.; Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiology Review. 53: 242-255.
7. Gao, M.; Li, R.; Dai, S.; Wu, Y.; Yi, D. 2008. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. Biological Control. 1-9.
8. Lee, D.; Akao, T.; Yamashita, S.; Katayama, H.; Maeda, M.; Saitoh, H.; Mizuki, E.; Ohba, M. 2000. Noninsecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic T cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 272: 218-223.
9. Akio, I.; Yasuyuki, S.; Sakae, K.; Yoshitomo, K.; Kyoko, K.; Kenjiro, M.; Eiichi M.; Tetsuyuki, A.; Michio, O. 2004. A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. The Journal of Biological Chemistry. 272: 21282-21286.

10. Bernhard, K.; Jarret, P.; Meadows, M.; Butt, J.; Ellis, D. J.; Roberts, G. M.; Pauli, S.; Rodgers, P.; Burges, H. D. 1997. Natural isolation of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insects pest. *Journal of Invertebrate Pathology*. 70: 59-68
11. Hernández, J. 1997. Caracterización Microscópica, Bioquímica y Molecular de Aislamientos Nativos de *Bacillus thuringiensis* en Colombia. Trabajo de Grado (Maestría en Biología). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
12. Pitre, L.; Hernández, J.; Bernal, J. 2008. Toxicidad de δ -endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(2):85-96.
13. Bravo, A.; Sarabia, S.; López, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villalobos, F.; Peña, G.; Núñez-valdez, M.; Soberón, M.; Quintero, R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(12): 4965-4972.
14. Ceron, J.; Covarrubias, L.; Quintero, R.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Aranda, E.; Lina, L.; Bravo, A. 1994. PCR, Analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 353 - 356.
15. Ramos, F.; Carmona, A.; Béres, M.; Méndez, N. 2004. Evaluación de asilamientos de *Bacillus thuringiensis* tóxicos a *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bioagro*. 16 (3): 183-188.
16. Bravo, A.; Cerón, J. 2004. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Editorial Buena Semilla. Primera edición. 107, 111, 73, 154.
17. Lopez, E.; Feltrinelli, M.; Nardini, L.; Santos, L.; Hardmeier, I.; Rouge, P.; Lagomarsino, A. 2002. Estudio de estabilidad de un inhibidor de proteasas (PMSF) en distintos solventes. Centro de Investigación y Desarrollo en Química y Petroquímica (CEQUIPE). Química. 20.
18. Martin, P.A.; Travers, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 2437-2442.
19. Ortiz, V.B.; Ortiz, C.A. 1980. Edafología. 3 ed. UACH. Chapingo. Edo. México.:123-130.
20. Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J.; Williams, S. 2000. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. novena edición. Editado por Hensy, W.R.- Lippincott Williams and Wilkins Co. Philadelphia, USA. 1109-1113, 1135.
21. Ammons, D.; Rampersad, J.; Khan, A. 2002. Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 79(3): 203-204.
22. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. 2003. *Brock. Biología de los Microorganismos*. Editorial Prentice Hall. Décima Edición. 1011.
23. Ibarra, J. E.; Federice, B. A. 1986. Isolation of a relatively non toxic 65 kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* var, israeliensis. *Journal of Bacteriology*. 165: 527 - 533.
24. De Barjac, H. 1982. Essai de classification biochimique sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type B. *thuringiensis*. *Entomophaga*. 7: 5 - 31.
25. Yamamoto, T.; McLaughen, R. G. 1981. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki toxic to the mosquito larvae *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 103: 414 - 421.
26. Aronson, A.I.; Beckman, W.; Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. *Microbiology Review*. 50: 1-24.
27. Lecadet, M. M.; Frachon, E.; Cosmao Dumanoir, V.; Ripouteau, H.; Hamon, S.; Laurent, P.; Thiéry, I. 1998. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 660-672.
28. Lecadet, M.; Dedondert, R. 1971. Biogenesis of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* during sporulation. *European Journal of Biochemistry*. 23: 282-294.

28. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
29. Chilcot, C. N.; Wigley, P. J. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insects habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology*.61: 244 -247.
30. Gough, J. M.; Kemp, D.; Akhurst, R.; Pearson, R.; Kongsuwan, K. 2005. Identification and characterization of proteins from *Bacillus thuringiensis* with high toxic activity against the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Journal of Invertebrate Pathology*.90: 39-46.
31. Barloy, F.; Delécluse, A.; Nicolas, L.; Lecaded, M. M. 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subs. Malasya, encoding a new mosquitoicidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Journal of Bacteriology*. 178: 3099-3105.
32. Zhang, J.; Hodgman, T. C.; Krieger, L.; Schnetter, W.; Schayrer, H. V. 1997. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *Journal of Bacteriology* 179: 4336-4341.
33. Arango, J.A.; Romero, M.; Orduz, S. 2002. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strain from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* Lepidoptera: Noctuidae. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 466-474.
34. Carreras, B.; Bravo, A.; Sánchez, J. F. 2004. Caracterización molecular de cuatro cepas de *Bacillus thuringiensis* relación con la actividad biológica. *Revista Protección vegetal*. 19 (2): 80-85.
35. Puerta, C.; Uruña, C. 2005. *Prácticas de Biología Molecular*. Pontificia Universidad Javeriana (Eds). Primera Edición. Bogotá. 100.
36. Gibbs, R.; Chamberlain, J.; Caskey, T. 1992. Diagnosis of new mutation diseases using the polymerase chain reaction. Chapter 15 in *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. USA.
37. Bernhard, K.; Jarret, P.; Medows, M.; Bitt, J.; Ellis, D. J.; Robewets, G. M.; Pauli, S.; Rodgers, P.; Burges, H. D. 1997. Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. 70: 59-68.
38. Thenius, W.; Aguda, R.; Cruz, W.; Declck, C.; Peferoen, M.; Lambert, B.; Brottrel, F.; Listsinger, J.; Cohen, M. 1998. *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution, delta-endotoxin diversity, and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae). *Bull Entomology Research*. 88: 335-342.
39. Ben-Dov, E.; Eivan, M.; Perleg, N.; Boussiba, S.; Zaritsky, A. 1996. Restriction map of the 125-kilobase plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp israelensis carrying the genes that encode delta-endotoxins active against mosquito larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(9): 3140-3145.
40. Chack, K.F.; Chao, D.C.; Tseng, M.Y.; Kao, S.S.; Tuan, S.J.; Feng, T.Y. 1994. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(7): 2415-2420.
41. Ferrandis, M.D.; Juarez-perez, V.M.; Frutos, R.; Ferre, J. 1999. Distribution of cryI, cryII and cryV genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. *System Applied Microbiology*. 22:179-185.
42. Kim, H.S.; Lee, D.W.; Woo, S.D.; Yu, Y.M.; Kang, S.K. 1998. Biological, immunological, and genetic analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from Granary in Korea. *Current Microbiology*. 37:52-57.
43. Marquéz, A. M.; Bergmann, M.; Ribeiro, J. M.; DIAZ, C. S. 1996. Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strain for specific detection of cryIII-type genes. Abstracts 20th Annual meeting 3rd international Colloquium on *B. thuringiensis*. Society for Invertebrate Pathology. Madrid, España. 52.
44. Niedmann, L.; L.; Meza-Basso, L. 2006. Evaluación de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* como Alternativa de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate *Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae en Chile. *Agricultura Técnica*. 66 (3): 235-246.
45. Galán, J. L.; García, S. S.; Santos, M. E.; Quintero, I. 1996. Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Monterrey, Mexico, Universidad de Nuevo León. 30-46.

46. 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 Biochemichal*. 72: 248-254.
47. Barrientos, R. 1997. Determinación de la constante térmica de desarrollo para la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Tesis Ing. Agr. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 44.
48. Beegle, C. 1990. Bioassays methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin En: *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*. American chemical society. USA
49. Schnepf, H.E.; Whiteley, H.R. 1985. Protein toxins of Bacilli. En: J.A. Hoch y P. Setlow (ed) *molecular biology of microbial differentietion*. washintong d.c. american society for microbiology. 209-216.