

## Aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* del sureste de México

Alejandro García Ramírez<sup>1</sup>

Arturo Reyes Ramírez<sup>1§</sup>

Esaú Ruíz Sánchez<sup>1</sup>

Jorge E. Ibarra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>División de Estudios de Posgrado e Investigación-Instituto Tecnológico de Conkal. Avenida Tecnológico s/n, Conkal, Yucatán. CP. 97345. (alexgara24@gmail.com; arturo.reyes@itconkal.edu.mx; esau.ruiz@itconkal.edu.mx). <sup>2</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-Instituto Politécnico Nacional-Unidad Irapuato. Libramiento norte carretera Irapuato-León km 9.6, Irapuato, Guanajuato. CP. 36500. (jibarra@ira.cinvestav.mx).

§Autor para correspondencia: arturo.reyes@itconkal.edu.mx.

### Resumen

Con el objetivo de encontrar aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*, en el presente trabajo se realizaron aislamientos a partir de diferentes materiales obtenidos del sureste de México, en el periodo de marzo 2014 a julio 2015. Se seleccionaron colonias bacterianas con base a las características típicas del género *Bacillus* y se identificaron como *Bacillus thuringiensis*, con base a la presencia de cristales parasporales, gen *cry*, gen *hag*, perfil de proteínas y actividad insecticida. Se obtuvo un aislado de muestras de suelo (ITCBT34) y dos de larvas de *Chlosyne lacinia* (ITCBT61, ITCBT62). Estos aislados presentaron amplificación de los genes *cry* y *hag*. El aislado ITCBT34 presentó cristales con morfología oval, mientras que los aislados ITCBT61 e ITCBT62 presentaron cristales bipiramidales. Se observaron diferencias en el tamaño del fragmento producido por la amplificación del gen *hag* y en el perfil de proteínas de los diferentes aislados. La actividad insecticida se determinó mediante bioensayo burdo con una concentración de 10 µg cm<sup>-2</sup>. Los tres aislados causaron 100% de mortalidad de larvas de *Manduca sexta* a las 96 h de exposición. Los aislados ITCBT61 e ITCBT62 mostraron características morfológicas y tamaño del gen *hag* similares a la cepa de referencia *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD1, el aislado ITCBT34 no presentó similitud, por lo que podría tratarse de un aislado no relacionado al serovar *kurstaki* HD1.

**Palabras clave:** *Chlosyne lacinia*, *Manduca sexta*, gen *cry*, gen *hag*.

Recibido: febrero de 2018

Aceptado: abril de 2018

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* es el entomopatógeno más usado en el control biológico de plagas agrícolas debido a su alta especificidad insecticida, la cual es conferida por la capacidad que tiene de formar inclusiones parasporales de naturaleza proteica, denominadas proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998). La nomenclatura de las proteínas Cry se basa en la secuencia de aminoácidos, esto permite clasificar las toxinas estrechamente relacionadas (Crickmore *et al.*, 1998), las proteínas Cry tienen actividad insecticida contra larvas de insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera (Burgess, 1982) y en algunos casos también contra hemípteros (Torres-Quintero *et al.*, 2015), himenópteros (van Frankenhuyzen y Tonon, 2013), ácaros (Erban *et al.*, 2009) y nemátodos de importancia agrícola (Li *et al.*, 2008).

Hay reportes de aislamientos de *B. thuringiensis* a partir de larvas de insectos enfermas o muertas a causa de patogénesis, del filoplano o de partes internas de las plantas (Monnerat *et al.*, 2009), en este caso presenta la propiedad de utilizar *B. thuringiensis* contra insectos de difícil control por sus hábitos de alimentación, como chupadores o barrenadores. Por lo que existe el interés en la búsqueda de nuevos aislados, con la finalidad de encontrar cepas que presenten actividad insecticida novedosa o con mayor actividad que los aislados y cepas de referencias conocidas (Saadaoui *et al.*, 2010). *B. thuringiensis* aislados a partir de suelo fueron significativamente más tóxicos contra *Pieris brassicae*, *Ephestia kuehniella* (Senfi *et al.*, 2012), *Heliothis armigera* y *Plutella xylostella* (Xavier *et al.*, 2007), que las cepas de referencia.

Cepas de *B. thuringiensis* nativas de México mostraron alta toxicidad hacia *Spodoptera frugiperda* al compararse con la cepa estándar comercial HD1 (Vázquez-Ramírez *et al.*, 2015). La cepa LBIT-1200, aislada de suelo mostró mayor actividad toxicidad contra *Manduca sexta* y *Trichoplusia ni* en comparación con la cepa HD-73 (Reinoso-Pozo *et al.*, 2016). La caracterización de aislados es importante para determinar si son variedades conocidas o determinar nuevas cepas de *B. thuringiensis* con características propias, al respecto, diversos reportes presentan caracterización de aislados de *B. thuringiensis* que incluyen la morfología del cuerpo parasporal (Azizoglu *et al.*, 2011), la actividad insecticida (Alper *et al.*, 2014) y la caracterización molecular (Sauka *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012).

Recientemente se utiliza la secuenciación de los genes *hag* que codifican las proteínas responsables de la formación de la flagelina, que es una alternativa a la técnica por serotipificación y permite la relación entre serotipos de *B. thuringiensis* (Reinoso-Pozo *et al.*, 2016). Con base en estudios previos, el objetivo de este trabajo fue aislar cepas nativas de *B. thuringiensis* a partir de diferentes tipos de muestras, que presenten potencial para ser usadas en el control biológico de plagas agrícolas de importancia económica en la región sureste de México.

## Materiales y métodos

### Aislamiento de *B. thuringiensis*

Se procesaron muestras obtenidas de suelo, larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidóptera: Noctuidae), larvas de *Chlosyne lacinia* ssp. *lacinia* Geyer (Lepidóptera: Nymphalidae), adultos de *Aidemona azteca* Saussure (Ortóptera: Acrididae), hojas de *Nerium*

*oleander* L. y rastrojo de *Zea mays* L. Estos materiales fueron obtenidos de diferentes regiones del sureste mexicano, las muestras de suelo fueron colectadas ocho en el estado de Tabasco, ocho en Yucatán, una en Campeche y una en Quintana Roo. Respecto a los demás materiales, se obtuvieron 23 muestras de larvas de *C. lacinia*, dos muestras de adultos de *A. azteca* y cuatro muestras de hojas de *N. oleander* en el municipio de Conkal, seis muestras de larvas de *S. frugiperda* y cinco muestras de rastrojo de maíz en el municipio de Tekax, ambos en el estado de Yucatán (Cuadro 1). Para el aislamiento de bacterias a partir de suelo se pesaron 5 g de la muestra y se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL, el cual fue aforado con agua destilada estéril hasta dicho volumen y la mezcla fue resuspendida mediante agitación vigorosa en Vortex durante 1 min. Se pasteurizó en baño María a 80 °C por 15 min y se enfrió inmediatamente en hielo.

**Cuadro 1. Descripción del tipo y número de muestras colectadas, municipio y estado, características de clima y suelo.**

| Muestras (numero)         | Lugar de colecta      | Características del clima*             | Tipo de suelo* |
|---------------------------|-----------------------|--|----------------|
| Suelo (2)                 | Huimanguillo, Tabasco | Cálido húmedo con lluvias todo el año  | Plintosol      |
| Suelo (1)                 | Jalapa, Tabasco       | Cálido húmedo con lluvias todo el año  | Leptocol       |
| Suelo (1)                 | Teapa, Tabasco        | Cálido húmedo con lluvias todo el año  | Luvisol        |
| Suelo (1)                 | Cunduacán, Tabasco    | Cálido húmedo con lluvias en verano    | Phaeosem       |
| Suelo (1)                 | Cárdenas, Tabasco     | Cálido húmedo con lluvias en verano    | Vertisol       |
| Suelo (1)                 | Paraíso, Tabasco      | Cálido húmedo con lluvias en verano    | Gleysol        |
| Suelo (1)                 | Centro, Tabasco       | Cálido húmedo con lluvias en verano    | Solonchak      |
| Suelo (1)                 | Baca, Yucatán         | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Phaeosem       |
| Suelo (2)                 | Conkal, Yucatán       | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Histosol       |
| Suelo (1)                 | Dzidzantun, Yucatán   | Semiseco muy cálido y cálido           | Histosol       |
| Suelo (1)                 | Acanceh, Yucatán      | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Histosol       |
| Suelo (1)                 | Chabihau, Yucatán     | Semiseco muy cálido y cálido           | Lixisol        |
| Suelo (1)                 | Tekax, Yucatán        | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Solonchak      |
| Suelo (1)                 | DB, Yucatán           | Semiseco muy cálido y cálido           | Lixisol        |
| Suelo (1)                 | BJ, Quintana Roo      | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Leptosol       |
| Suelo (1)                 | Calakmul, Campeche    | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Phaeosem       |
| Rastrojo maíz (5)         | Tekax, Yucatán        | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Solonchak      |
| <i>N. oleander</i> (4)    | Conkal, Yucatán       | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Histosol       |
| <i>S. frugiperda</i> (10) | Tekax, Yucatán        | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Solonchak      |
| <i>C. lacinia</i> (23)    | Conkal, Yucatán       | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Histosol       |
| <i>A. azteca</i> (2)      | Conkal, Yucatán       | Cálido subhúmedo con lluvias en verano | Histosol       |

\* = INEGI (2017a, b, c, d); DB= Dzilam de Bravo; BJ= Benito Juárez.

Se tomaron 5 mL de la suspensión y se adicionó a un matraz que contenía 50 mL de caldo nutritivo (BD Bioxon<sup>®</sup>) y 0.25 M de acetato de sodio (Fermont) (para inhibir la germinación de las esporas de *B. thuringiensis*), se incubó durante 4 h a 200 rpm y a 29 °C. Luego se tomó 1 mL del cultivo y se diluyó en 1 mL de agua destilada estéril. Esta muestra se sometió nuevamente al proceso de pasteurización, el cual es recomendado para inactivar el crecimiento de otros microorganismos en

el medio de cultivo (Travers *et al.*, 1987). Al final del segundo proceso de pasteurización, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  y se distribuyó uniformemente en una caja de Petri con agar nutritivo. Las cajas de Petri se incubaron a 30 °C durante 24 h para favorecer la germinación de las esporas de *B. thuringiensis* y el desarrollo de las colonias bacterianas.

Para el aislamiento bacteriano a partir de larvas e insectos adultos se procesaron de 3 a 5 individuos por muestra dependiendo del tamaño de éstos, la cuales fueron maceradas directamente en el tubo con ayuda de una varilla de cristal y posteriormente se aforó con agua destilada estéril hasta 15 mL, se agito vigorosamente (Aldebis *et al.*, 1994). En el caso de los aislamientos a partir de hojas de plantas se pesaron 2 g de la muestra, se desinfectó en solución de 2% hipoclorito de sodio, durante 10 min y se aplicó doble lavado con agua destilada, la muestra se maceró finamente en un mortero y se le adicionaron 15 mL de agua destilada estéril, la solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL (Monnerat *et al.*, 2009). En ambos casos se realizó un proceso de pasteurización y se continuó con el proceso descrito para la obtención de aislados a partir de muestras de suelo.

Se seleccionaron colonias individuales de acuerdo a las características típicas reportadas para *Bacillus* (Sneath, 1986). Posteriormente se realizaron pruebas para verificar tinción de Gram positiva y reacción de catalasa positiva. Los aislados seleccionados se cultivaron individualmente en agar nutritivo (Bioxon<sup>®</sup>) y se conservaron a 4 °C para estudios posteriores.

### **Caracterización morfológica del cuerpo parasporal**

La presencia y morfología parasporal de los aislados seleccionados se realizó mediante la observación directa de los cristales bajo microscopio óptico DM500 (Leica Microsystems, Suiza) (1000X), se confirmó la morfología mediante frotis directo en contraste de fases y tinción con azul de Coomassie (Sharif y Alaeddinoğlu, 1988).

### **Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN total se realizó de acuerdo al método modificado reportado por Rosso y Delécluse (1997). Se obtuvo un cultivo bacteriano de 2 mL en medio Luria-Bertani<sup>®</sup> (Invitrogen) a 28 °C con agitación constante a 250 rpm durante toda la noche, se centrifugó a 8 000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de buffer J (1.0 M TrisHCl, 0.1 M EDTA y 0.15 M NaCl, pH 8). Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores, se resuspendió paquete celular en 300  $\mu\text{L}$  de buffer J conteniendo 40 mg mL de lisozima (Sigma Aldrich Química) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de SDS al 10%, se homogenizó suavemente y se incubó a 70 °C por 20 min.

Se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de RNAsa (Promega) (10 mg mL), 10  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (10 mg mL) (Thermo Fisher Scientific) y se incubó a 60 °C durante 90 min. Se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M (Baker, J. T.) y se incubó en hielo agitándolo constantemente. Se centrifugó a 13 000 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenadante, se precipitó con el mismo volumen de isopropanol (Sigma) y se incubó a -70 °C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó bajo las condiciones anteriores y se eliminó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 200  $\mu\text{L}$  de etanol (Fermont) al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente, el ADN se resuspendió en 20  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y se conservó a -20 °C hasta su uso.

### **Amplificación de genes *cry* y *hag***

Para determinar la presencia de genes *cry* en los aislados, se realizó la amplificación por PCR con los iniciadores universales del bloque 1 (5' TATGCWCAAGCWCCAATYTWCATYT3') y bloque 5 (5' GGRATAAATTCAATTYKRTCWA 3') (Sigma Aldrich Química) de acuerdo a Noguera e Ibarra (2010).

Se determinó la presencia del gen *hag* de la flagelina en los aislados nativos mediante una PCR con los iniciadores específicos Bthag-F1 (5'-AGTACATGCGCCAAAACCAAG) y Bthag-R1 (5'-GTTTGCTTGAGAAAGCATGCT) (Sigma Aldrich Química) de acuerdo a Xu y Coté (2006). Los productos de PCR fueron verificados por medio de electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 0.8%, y visualizado en un fotodocumentador Biorad Molecular Imager Gel Doc XR (Bio-Rad®).

### **Perfil de proteínas**

Se obtuvo el perfil de proteínas mediante electroforesis en SDS-PAGE del complejo espora-cristal de los aislados de acuerdo a la metodología reportada (Laemmli 1970). Para lo cual, se inoculó cada aislado en 5 mL de medio LB y se incubó en un agitador orbital a 30 °C con 200 rpm durante 72 h. El complejo espora-cristal se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min y se lavó con agua destilada estéril, esta operación se repitió tres veces. Se recuperó la pastilla y se conservó a 4 °C. Se preparó una mezcla con 5 µL de buffer de carga con 5% de β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich Química), 3 µL de muestra del complejo espora-cristal y 2 µL de agua, se incubó a 95 °C durante 10 min.

Para la electroforesis se preparó un gel separador al 12% y el compactador al 4% de poliacrilamida (Sigma Aldrich Química), los componentes utilizados fueron poliacrilamida al 30%, buffer Tris-HCL pH 8.8 (Sigma Aldrich Química), buffer Tris-HCL pH 6.8, SDS al 10%, agua destilada estéril, TEMED (Invitrogen®) y persulfato de amonio (Sigma Aldrich Química) al 10%, se preparó un volumen de 5 mL para cada gel y las concentraciones fueron calculadas de acuerdo a las instrucciones en el manual del fabricante. Se realizó la electroforesis en una cámara de electroforesis vertical modular Enduro™ (Bio-Rad), se utilizó el marcador de peso molecular de proteínas Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Bio-Rad®).

La electroforesis se realizó en dos fases, la de compactación a 40 V y 100 A durante 1 h y la fase de separación se llevó a cabo a 90 V y 100 A durante 3 h. Posteriormente el gel fue teñido con una solución de colorante azul de Coomassie G-250 al 0.1% durante 1 h y se destiñó en metanol/ácido acético. Se estimó el peso molecular de las bandas de proteínas presentes en cada muestra según el marcador de peso molecular utilizado. Los perfiles de proteínas observados fueron comparados con el perfil de la cepa de referencia *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1.

### **Detección de actividad insecticida**

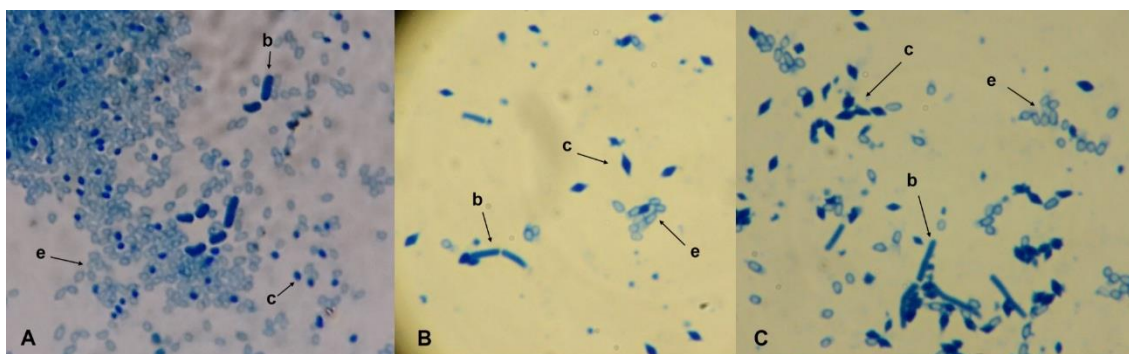
Se realizó un ensayo preliminar a una alta concentración con los aislados obtenidos para determinar la actividad insecticida contra *Manduca sexta*, ya que diversos estudios reportan dosis letales bajas para diversos insectos lepidópteros que van desde 1 a 164 ng cm<sup>-2</sup> (Uribe *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2010). Se obtuvo el liofilizado del complejo espora-cristal en una liofilizadora Labconco Lymph-Lock 4.5 (Labconco®), se utilizó una concentración final de 10 µg cm<sup>-2</sup>. Se pesó la muestra y se

diluyó en 200  $\mu\text{L}$  de Tween 80 (Sigma Aldrich Química) (0.02%), se adicionó a la caja de Petri con la dieta artificial (Yamamoto, 1969) para el insecto y se distribuyó uniformemente en toda la superficie de la dieta, se dejó secar la superficie durante 45 min y se colocaron 20 larvas neonatas para cada aislado con dos repeticiones y se registró la mortalidad a las 96 h, como control negativo se utilizó 0.02% de Tween 80.

## Resultados y discusión

### Aislamiento de *B. thuringiensis*

Se procesaron 62 muestras representativas de diversos materiales colectados, entre los cuales se incluyó 18 muestras de suelo, 10 de *Spodoptera frugiperda*, 23 de *Chlosyne lacinia* ssp. *lacinia*, dos de *Aidemona azteca*, cuatro de hojas de *Nerium oleander* y cinco muestras de rastrojo de *Zea mays*. Se seleccionaron en total 210 colonias, de las cuales sólo en 27 se observó la presencia de estructuras en los esporangios, entre las cuales se observaron cuerpos esféricos, amorfos, bipiramidales, cúbicos, ovoides y algunos adheridos a las esporas. La prueba de tinción con azul de Coomassie (Figura 1) permitió confirmar sólo en tres aislados la presencia de cristales parasporales, los cuales fueron designados con las claves ITCBT34, ITCBT61 e ITCBT62 (Cuadro 2). Estos aislados seleccionados fueron utilizados en las pruebas posteriores.



**Figura 1.** Morfología del cuerpo parasporal mediante tinción con azul de Coomassie. A= ITCBT34. B= ITCBT61. C= ITCBT62; b) célula vegetativa; c) cristal parasporal; y e) espora.

Estudios previos han reportado la obtención de aislados nativos de *B. thuringiensis* a partir de hábitats como suelo (Adbullah *et al.*, 2014), plantas (Alper *et al.*, 2014) e insectos (Alquisira-Ramírez *et al.*, 2014). En esta diversidad de ambientes es posible encontrar aislados que presentan cristales bipiramidales, esféricos, cúbicos (Cicero *et al.*, 2009, Azizoglu *et al.*, 2011) e irregulares (Assaedi *et al.*, 2011). En relación al sureste de México, hay reportes de aislamientos de *B. thuringiensis* sólo a partir de suelos en los estados de Tabasco (Bravo *et al.*, 1998) y Yucatán (Ornelas-Pérez *et al.*, 2016).

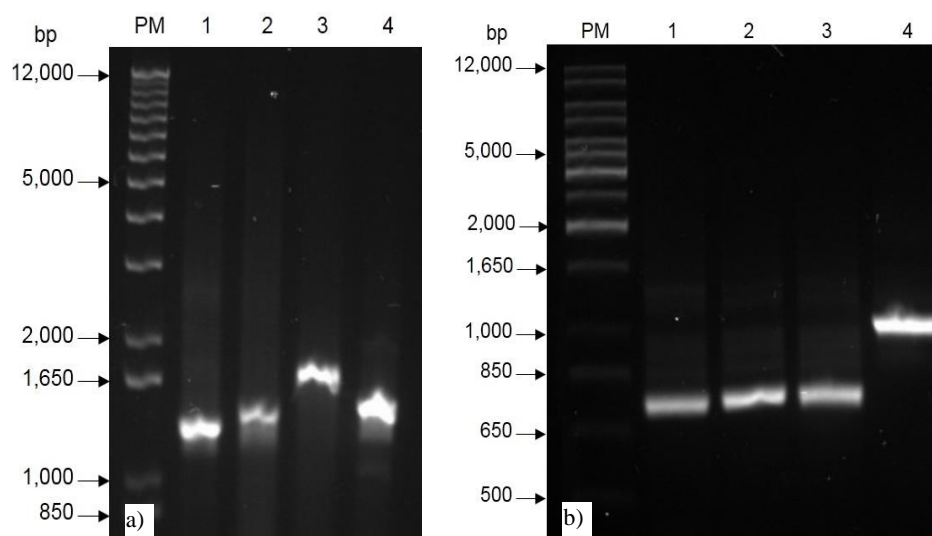
En el presente trabajo los aislados seleccionados que fueron confirmados como *B. thuringiensis* presentaron cristales ovales, muestra obtenida de suelo, y bipiramidales de muestras de larvas de *Chlosyne lacinia* (Cuadro 2). El índice de aislamiento de *B. thuringiensis* obtenido fue de 0.11. Este resultado se encuentra dentro de los valores reportados previamente, ya que es posible encontrar reportes con índices de 0.04 a 1 (Rosas-García *et al.*, 2008; Alper *et al.*, 2014).

**Cuadro 2. Características de los aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*.**

| Aislado | Hábitat                                       | Lugar de colecta      | Localización del sitio (GPS)  | Morfología parasporal | Genes <i>cry</i> | Genes <i>hag</i> |
|---------|---|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| ITCBT34 | Suelo   | Huimanguillo, Tabasco | 17°53'26.31",<br>93°26'32.48" | Ovoide                | +                | +                |
| ITCBT61 | <i>Chlosyne lacinia</i> ssp. <i>lacinia</i> . | Conkal, Yucatán       | 21°4'45.85"<br>89°29'59.46"   | Bipiramidal           | +                | +                |
| ITCBT62 | <i>Chlosyne lacinia</i> ssp. <i>lacinia</i> . | Conkal, Yucatán       | 21° 4'16.55"<br>89°30'24.16"  | Bipiramidal           | +                | +                |

**Amplificación de genes *cry***

Los tres aislados mostraron la presencia de genes *cry*, presentaron bandas de amplificación con tamaños aproximados de 1400 pb (ITCBT61), 1500 pb (ITCBT62), 1650 pb (ITCBT34) y 1300 pb en la cepa de referencia (HD1) (Figura 2a). El uso de iniciadores universales es común para determinar la presencia de genes *cry* (Patel *et al.*, 2012; Reinoso-Pozo *et al.*, 2016). De acuerdo a la morfología bipiramidal de los cristales parasporales de los aislados ITCBT61 e ITCBT62, es probable que las bandas de amplificación estén correlacionadas con genes tipo *cry1* y *cry2*, los cuales codifican proteínas tóxicas principalmente hacia larvas de Lepidópteras (Sun *et al.*, 2007; Sauka y Benintende, 2008). Por otro lado, el fragmento amplificado en el aislado ITCBT34 muestra un tamaño de banda diferentes (Figura 2a), por lo que podría tratarse de otro tipo de gen *cry*.



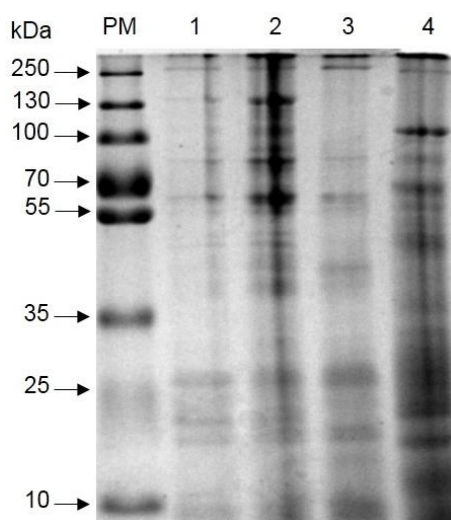
**Figura 2. Amplificación de genes *cry* (a) y genes *hag* (b) en los aislados de *B. thuringiensis*. PM= marcador de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), carril 1: HD1, carril 2: ITCBT61, carril 3: ITCBT62, carril 4= ITCBT34.**

### Determinación de genes *hag*

Los tres aislados presentaron productos de amplificación del gen *hag* por PCR (Figura 2b). Los aislados ITCBT61 e ITCBT62 presentaron una banda de tamaño aproximado de 700 pb, similar a la banda que mostró la cepa de referencia HD1. El aislado ITCBT34 presentó una banda de tamaño diferente de aproximadamente 1000 pb. Los fragmentos amplificados de los genes *hag* reportados en *B. thuringiensis* muestran polimorfismo con bandas con tamaños de 700 bp hasta 1.9 kb (Xu y Coté, 2006). El tamaño del fragmento del gen *hag* del aislado ITCBT34 refuerza que se trata de un aislado diferente a los otros dos (ITCBT61 e ITCBT62) y a la cepa de referencia HD1. La determinación de la presencia de los genes de la flagelina es un método que está adquiriendo uso como alternativa a la serotipificación en *B. thuringiensis* (Hendriksen y Hansen, 2006; Reinoso-Pozo *et al.*, 2016).

### Perfil de proteínas

Mediante el análisis del SDS-PAGE se determinó el perfil de proteínas de los tres aislados en estudio. Los perfiles observados fueron diferentes entre los aislados y únicamente el aislado ITCBT61 coincidió con el perfil de la cepa de referencia HD1. En el caso del aislado ITCBT62, se observó la presencia de una banda de 45 kDa y la ausencia de una banda de 130 kDa que está presente en el aislado ITCBT61 y la cepa HD1, el ITCBT34 presentó un perfil de bandas diferentes de 100, 85, 70 y 50 kDa (Figura 3).



**Figura 3. SDS-PAGE del perfil de proteínas presentado por los aislados nativos de *B. thuringiensis*.** PM= marcador de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), carril 1: HD1, carril 2: ITCBT61, carril 3: ITCBT62, carril 4= ITCBT34.

Se reportan principalmente bandas de 130 y 65 kDa para la cepa HD1, las cuales son producto de proteínas codificadas por los genes *cry1* y *cry2* (Alper *et al.*, 2014), por lo que las bandas de 130 y 65 kDa de peso molecular que presentaron los aislados nativos, pueden pertenecer al grupo de las proteínas Cry1 y Cry2. El perfil de proteínas que se ha observado en otros trabajos varía, pero el rango de peso molecular de las bandas es de 130 a 44 kDa (Silva *et al.*, 2010;



Barathi *et al.*, 2012). Estudios previos han reportado la presencia de proteínas de tamaños similares a los obtenidos en el presente trabajo, las cuales mostraron toxicidad principalmente contra plagas del orden Lepidoptera (Valicente *et al.*, 2010; Li y Bouwer, 2012).

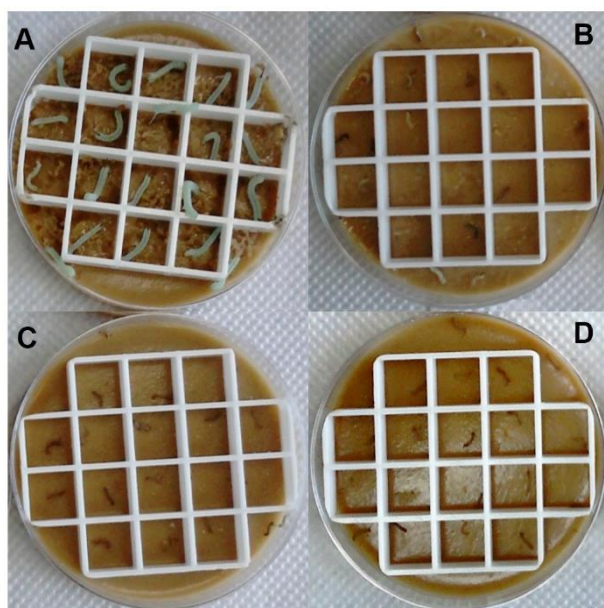
### Actividad insecticida

La prueba de actividad insecticida se realizó con una concentración de  $10 \mu\text{g cm}^{-2}$ , los tres aislados presentaron actividad insecticida contra larvas de *Manduca sexta*. A las 96 h se observó 100% de mortalidad de larvas (Cuadro 3). Las larvas expuestas a los aislados presentaron síntomas de necrosamiento general y licuado interno, características típicas de la toxicidad causado por las proteínas Cry de *B. thuringiensis* (Silva *et al.*, 2010) (Figura 4).

**Cuadro 3. Bioensayo cualitativo de actividad insecticida de los aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* contra *Manduca sexta* a las 96 h, con una concentración de  $10 \mu\text{g cm}^{-2}$ .**

| Aislado   | Promedio* | Mortalidad (%) |
|-----------|-----------|----------------|
| ITCBT34   | 20        | 100 $\pm$ 0    |
| ITCBT61   | 20        | 100 $\pm$ 0    |
| ITCBT62   | 20        | 100 $\pm$ 0    |
| Testigo** | 20        | 0 $\pm$ 0      |

\* = Promedio del número de larvas muertas de dos repeticiones, con 20 larvas cada una. \*\* = Tween 80 (0.02 %).



**Figura 4. Ensayo cualitativo de aislados nativos de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *Manduca sexta* a una concentración de  $10 \mu\text{g cm}^{-2}$ . A) testigo negativo (Tween 80), B)= ITCBT34, C)= ITCBT61 y D)= ITCBT62.**

La actividad observada en los aislados ITCBT61 e ITCBT62 responde a lo esperado, ya que ambos aislados presentan morfología parasporal bipiramidal y perfil de proteínas típica de las proteínas Cry1 y Cry2, las cuales tienen actividad insecticida contra larvas de Lepidóptera. El aislado ITCBT34 también tuvo actividad hacia estas larvas. Este resultado no es común, ya que este aislado presentó morfología del cuerpo parasporal y perfil de proteínas muy diferente al tipo de proteínas que actúan sobre larvas de Lepidóptera. Dicha actividad puede estar relacionada a la presencia de genes tipo *cry2*, los cuales fueron reportados en aislados de *B. thuringiensis* con cristales de morfología únicamente oval (Arrieta y Espinoza, 2006).

La presencia de genes *cry1* y *cry2* y la actividad contra larvas de Lepidóptera es característico de *B. thuringiensis*, y es reportado con frecuencia en trabajos sobre búsqueda y caracterización de aislados nativos. En esos trabajos se utilizaron diversas especies de Lepidóptera como *Cadra cautella* y *Thaumetopoea wilkinsoni* (Yilmaz *et al.*, 2013), *Spodoptera littoralis* (Assaeedi *et al.*, 2011), *Heliothis armígera* y *Plutella xylostella* (Xavier *et al.*, 2007) e incluso contra larvas de Coleóptera como *Carpophilus hemipterus* (Alper *et al.*, 2014).

## Conclusiones

En general se observó similitud en las pruebas entre los aislados nativos del presente trabajo y la cepa de referencia *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, como morfología bipiramidal y tamaño en la amplificación de los genes *hag* en los aislados ITCBT61 e ITCBT62, además del perfil de proteínas y amplificación de genes *cry* en el aislado ITCBT61. Esto muestra que los aislados ITCBT61 e ITCBT62 están altamente relacionados con la cepa *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1. Respecto al aislado ITCBT34, en los resultados de todas las pruebas realizadas no se observó ninguna similitud con la cepa HD1, indicando con ello que este aislado pertenece a una variedad diferente. Finalmente, el resultado de la prueba de toxicidad muestra que los tres aislamientos presentan potencial para el control de plagas del orden Lepidópteros.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Miguel Ángel Mejía Bautista, Javier Luévano Borroel y Leandro Gabriel Ordoñez por el apoyo técnico brindado.

## Literatura citada

- Abdullah, R. R.; Sukar, N. A. and Ghanim, N. M. 2014. Improving efficacy of *Bacillus thuringiensis* against insects of different feeding habits by plasmid transfer technique of chitinase. Egypt. J. Biol. Pest Control. 24(1):37-44.
- Aldebis, H. K.; Osuna, E. V. y Álvarez, C. S. 1994. Caracterización serológica de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner aisladas de insectos españoles. Bol. San. Veg. Plagas. 20(3):765-769.
- Alper, M.; Güneş, H.; Tatlipinar, A.; Çöl, B.; Civelek, H. S.; Özkan, C. and Poyraz, B. 2014. Distribution, occurrence of *cry* genes, and lepidopteran toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolated from fig tree environments in Aydın Province. Turk. J. Agric. For. 38(6):898-907.

- Alquisira, R. E. V.; Paredes, G. J. R.; Hernández, V. V. M.; Ramírez, T. J. A. and Peña, C., G. 2014. In vitro susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie*. 45(6):707-718.
- Arrieta, G. and Espinoza, A. M. 2006. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. *Rev. Biol. Trop.* 54(1):13-27.
- Assaedi, A. S. A.; Osman, G. E. H. and Abulreesh, H. H. 2011. The occurrence and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* in the arid environments. *Aust. J. Crop. Sci.* 5(10):1185-1190.
- Azizoglu, U.; Yilmaz, S.; Ayvaz, A.; Karaborklu, S. and Akbulut, M. 2011. Characterization of local *Bacillus thuringiensis* isolates and their toxicity to *Ephestia kuehniella* (zeller) and *Plodia interpunctella* (hubner) larvae. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 21(2):143-150.
- Barathi, S.; Sangeetha, P.; Karthick, C.; Govindaraju, S. and Arulselvi, P. I. 2012. Diversity in protein profile of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from varied soil environments. *J. Pharm. Res.* 5(9):4645-4647.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; López, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villalobos, F. J.; Peña, G. and Núñez, V. M. E. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol.* 64(12):4965-4972.
- Burges, H. D. 1982. Control of insects by bacteria. *Parasitology.* 84(4):79-117.
- Cicero, E. A. S.; Ferraudo, A. S. and Lemos, M. V. F. 2009. Identification of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* effective against *Sphenophorus levis*, the sugar-cane borer. *Bragantia.* 68(4):817-823.
- Crickmore, N.; Zeigler, D. R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J. and Dean, D. H. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Rev.* 62(3):807-813.
- Erban, T.; Nesvorna, M.; Erbanova, M. and Hubert, J. 2009. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* control of synanthropic mites (Acari: Acaridida) under laboratory conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 49(4):339-346.
- Hendriksen, N. B. and Hansen, B. M. 2006. Detection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1 on cabbage for human consumption. *FEMS Microbiol. Lett.* 257(1):106-111.
- INEGI. 2017a. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario estadístico y geográfico de Campeche 2017. [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/anuarios\\_2017/702825095109.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825095109.pdf).
- INEGI. 2017b. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario estadístico y geográfico de Quintana Roo 2017. [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/anuarios\\_2017/702825095130.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825095130.pdf).
- INEGI. 2017c. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario estadístico y geográfico de Tabasco 2017. [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/anuarios\\_2017/702825095123.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825095123.pdf).
- INEGI. 2017d. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario estadístico y geográfico de Yucatán 2017. [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/anuarios\\_2017/702825095116.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825095116.pdf).

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- Li, H. and Bouwer, G. 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *J. Invertebr. Pathol.* 109(1):110-116.
- Li, X. Q.; Tan, A.; Voegtline, M.; Bekele, S.; Chen, C. S. and Aroian, R.V. 2008. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. *Biol. Control*. 47(1):97-102.
- Monnerat, R. G.; Soares, C. M.; Capdeville, G.; Jones, G.; Martins, É. S.; Praça, L.; Cordeiro, B. A.; Braz, S. V.; dos-Santos, R. C. and Berry, C. 2009. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. *Microbial Biotechnol.* 2(4):512-520.
- Noguera, P. A. and Ibarra, J. E. 2010. Detection of new *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(18):6150-6155.
- Ornelas, P. J. F.; Maldonado, B. M. G.; Elías, S. M.; Flores, G. M. D. S.; Lozano, C. M. G. and Wong, L. J. G. 2016. Evaluación de la mortalidad causada por cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y formulados preparados contra *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua*, y *Helicoverpa zea*. *Southwest Entomol.* 41(4):1095-1110.
- Patel, K. D.; Chudasama, C. J. and Ingle, S. S. 2012. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from diverse habitats of India. *J. Basic Microbiol.* 52(4):437-445.
- Reinoso, P. Y.; del Rincón, C. M. C. and Ibarra, J. E. 2016. Characterization of a highly toxic strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* very similar to the HD-73 strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 363(17), fnw188.
- Rosas, G. N. M.; Mireles, M. M.; Hernández, M. J. L. and Ibarra, J. E. 2008. Screening of *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from avocado orchards in México, and their insecticidal activity towards *Argyrotaenia* sp. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *J. Appl. Microbiol.* 104(1):224-230.
- Rosso, M. L. and Delécluse, A. 1997. Distribution of the insertion element IS240 among *Bacillus thuringiensis* strains. *Curr. Microbiol.* 34(6):348-353.
- Saadaoui, I.; Al-Thani, R.; Al-Saadi, F.; Belguith-Ben, H. N.; Abdelkefi-Mesrati, L.; Schultz, P.; Rouis, S. and Jaoua, S. 2010. Characterization of Tunisian *Bacillus thuringiensis* strains with abundance of *kurstaki* subspecies harbouring insecticidal activities against the Lepidopteran insect *Ephestia kuehniella*. *Curr. Microbiol.* 61(6):541-548.
- Sauka, D. H. y Benintende, G. B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades: un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. Microbiol.* 40(2):124-140.
- Sauka, D. H.; Basurto, R. R. E.; Ibarra, J. E. and Benintende, G. B. 2010. Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotrop. Entomol.* 39(5):767-773.
- Schnepf, E.; Crickmore, N. V.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. R. and Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):775-806.
- Senfi, F.; Safaralizadeh, M. H.; Safavi, S. A. and Aramideh, S. 2012. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from apple orchards at Urmia, Iran and their toxicity to lepidopteran pests, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Pieris brassicae* L. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 22(1):33-37.
- Sharif, F. A. and Alaeddinoglu, N. G. 1988. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. Ind. Microbiol.* 3(4):227-229.

- Sharma, P.; Nain, V.; Lakhanpaul, S. and Kumar, P. A. 2010. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). Lett. Appl. Microbiol. 51(1):42-47.
- Silva, N. D.; Thuler, A. M. G.; Abreu, I. L. D.; Davolos, C. C.; Polanczyk, R. A. and Lemos, M. V. F. 2010. Characterization and selection of *Bacillus thuringiensis* isolates effective against *Sitophilus oryzae*. Sci. Agric. 67(4):472-478.
- Sneath, P. H. A. 1986. Section 13. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. P. H. A. Sneath, (Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 2:1104-1138.
- Sun, Y.; Wei, W.; Ding, X.; Xia, L. and Yuan, Z. 2007. Detection of chromosomally located and plasmid-borne genes on 20 kb DNA fragments in parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis*. Arch. Microbiol. 188(4):327-332.
- Torres, Q. M. C.; Peña, C. G.; Hernández, V. V. M. and Arenas, S. I. 2015. Signs of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) infection in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae): Koch's postulates. Fla. Entomol. 98(2):799-802.
- Travers, R. S.; Martin, P. A. W. and Reichelderfer, C. F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 53(6):1263-1266.
- Uribe, D.; Martínez, W. and Cerón, J. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. J. Invertebr. Pathol. 82(2):119-127.
- Valicente, F. H.; de Toledo, P. E. A.; de Vasconcelos, M. J. V.; Carneiro, N. P.; Carneiro, A. A.; Guimarães, C. T. and Lana, U. G. 2010. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cryI* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Biol. Control. 53(3):360-366.
- van Frankenhuyzen, K. and Tonon, A. 2013. Activity of *Bacillus thuringiensis* cyt1Ba crystal protein against hymenopteran forest pests. J. Invertebr. Pathol. 113(2):160-162.
- Vázquez-Ramírez, M. F.; Rangel-Núñez, J. C.; Ibarra, J. E. y del Rincón-Castro, M. C. 2015. Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Interciencia. 40(6):397-402.
- Xavier, R.; Nagarathinam, P.; Murugan, V. and Jayaraman, K. 2007. Isolation of Lepidopteran active native *Bacillus thuringiensis* strains through PCR panning. Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5(2):61-67.
- Xu, D. and Coté, J. C. 2006. Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* sensu lato flagellin (h antigen) protein: comparison with h serotype diversity. Appl. Environ. Microbiol. 72(7):4653-4662.
- Yamamoto, R. T. 1969. Mass rearing of the tobacco hornworm. II. Larval rearing and pupation. J. Econ. Entomol. 62(6):1427-1431.
- Yilmaz, S.; Karabörklü, S.; Azizoglu, U.; Ayvaz, A.; Akbulut, M. and Yildiz, M. 2013. Toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolates on the larval stages of pine processionary moth *Thaumetopoea wilkinsoni* at different temperatures. Turk. J. Agric. For. 37(2):163-172.