

**MÉTODOS ESTANDARIZADOS PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE
Bacillus thuringiensis PARA EL CONTROL DE
INSECTOS PLAGA:
MODELO *Tuta absoluta***



UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ
JORGE TADEO LOZANO

**MÉTODOS ESTANDARIZADOS PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus*
thuringiensis PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA:
MODELO *Tuta absoluta***

AUTORES

Javier Hernández-Fernández
Lorena Ramírez-Reyes
Natalia Ramírez-Hernández
Luz Stella Fuentes-Quintero



UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ
JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales

Métodos estandarizados para la caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos plaga: modelo *Tuta absoluta* / Javier Hernández-Fernández ... [et al.]. – Bogotá: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2012.
60 p.: il. col.; 28 cm.

ISBN: 978-958-725-105-0

1. CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS. 2. BACILLUS THURINGIENSIS 3. TOMATES – ENFERMEDADES Y PLAGAS. 4. POLILLA DEL TOMATE – CONTROL BIOLÓGICO. 5. CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS. 6. INSECTOS ÚTILES Y PERJUDICIALES. I. Hernández-Fernández, Javier.

CDD632.96“M593”

Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2012.
Carrera 4 No. 22-61 / PBX: 242 7030 /www.utadeo.edu.co

MÉTODOS ESTANDARIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA: MODELO *Tuta absoluta*

ISBN:

Primera edición: 2012

RECTORA:

Cecilia María Veléz White

VICERRECTOR ACADÉMICO:

Diógenes Campos Romero

DECANO FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA:

José Daniel Bogoya Maldonado

DIRECTOR DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES:

Iván Rey Carrasco

DIRECTOR (E) DE PUBLICACIONES:

Jaime Melo Castiblanco

COORDINACIÓN EDITORIAL Y REVISIÓN DE TEXTOS:

HENRY COLMENARES MELGAREJO

DISEÑO DE PORTADA:

Oscar Joan Rodríguez

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN:

Oscar Joan Rodríguez

IMPRESIÓN: PANAMERICANA FORMAS E IMPRESOS S.A.

IMPRESO EN COLOMBIA - PRINTED IN COLOMBIA

TABLA DE CONTENIDO

PREFACIO	7
INTRODUCCIÓN	9
El tomate: descripción general	10
Bacillus thuringiensis: la bacteria insecticida	12
β-exotoxinas	14
Quitinasas	15
Proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento (VIP)	15
BIOTECNOLOGÍA DE <i>B. thuringiensis</i>	16
Desarrollo de biopesticidas con base en <i>B. thuringiensis</i>	16
Plantas – <i>B. thuringiensis</i>	16
ENSAYOS BIOLÓGICOS CON <i>B. thuringiensis</i>	18
Ensayos biológicos con cepas o productos convencionales	18
Dietas artificiales	18
Forma de aplicación.....	18
Dosis	18
Insecto	19
Diseño experimental y análisis estadístico en bioensayos	19
LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	20
Genes codificantes de proteínas insecticidas de <i>B. thuringiensis</i>	20
PROTOCOLOS ESTANDARIZADOS DE CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA, BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y BIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>23	
CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA	24
Objetivo	24
Área de dominio o aplicación.....	24
Definición y abreviaciones	24
Principio del método	24
Método de trabajo	25
Equipos y materiales.....	25
Medios de cultivo.....	25
Material biológico	25
Preparación de medios de cultivo y soluciones.....	26
Procedimiento	26

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	26
Objetivo	26
Área de dominio o aplicación.....	27
Definición y abreviaciones	27
Principio del método	27
Método de trabajo	28
Esterilización del material.....	28
Material biológico	30
Procedimiento	30
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	31
Objetivo	31
Área de dominio o aplicación.....	31
Definición y abreviaciones	31
Principio del método	31
Método de trabajo	32
Productos utilizados	32
Equipos y materiales.....	32
Medios de cultivo.....	33
Material biológico	33
Medios de cultivo y soluciones stock	33
Medio Luria Bertani	33
Tampón de carga	33
EDTA 0,5 M pH 8,0.....	33
Bromuro de etidio.....	33
Cloruro de magnesio MgCl ₂ 1 M.....	33
Tris 1M.....	33
Tris borato (TBE)	34
Geles de agarosa al 1%	34
Procedimiento	34
Extracción de ADN.....	34
El ADN	34
Condiciones para la amplificación por PCR	35
Condiciones para la amplificación por PCR.....	35
Control de calidad	36
Control de calidad	37

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y SOLUBILIZACIÓN DE CRISTALES	38
Introducción.....	38
Objetivos	38
Área dominio o aplicación.....	38
Definición y abreviaciones	39
Materiales.....	39
Equipos.....	40
Metodología.....	40
Esterilización del material	40
Material biológico.....	40
Medios de cultivo y soluciones stock.....	40
Medio Luria Bertani. Ver caracterización microscópica	40
Medio leche peptonizada modificada	40
Preparación del reactivo de Bradford	40
Preparación de cloruro de sodio	41
Preparación de la solución concentrada de albúmina de suero bovino	41
Preparación de las soluciones	41
Determinación de proteínas por la técnica de Bradford	41
Procedimiento	41
Obtención de extractos crudos	41
Cuantificación de proteínas totales en los extractos crudos por la técnica de Bradford.....	42
CRÍA DEL INSECTO PLAGA <i>Tuta absoluta</i> Y MONTAJE DE BIOENSAYOS	43
Introducción.....	43
Objetivos	43
Área de dominio o aplicación.....	43
Definiciones	43
Materiales	43
Equipos.....	44
Metodología	44
Montaje de los bioensayos.....	45
BIBLIOGRAFÍA	47

PREFACIO

Las pérdidas ocasionadas por insectos en los diferentes cultivos comerciales representan de un 10 a un 30% de los costos de producción, llegando a ser mayores en algunos cultivos y épocas del año. Los insecticidas químicos se han constituido en el principal método de control de plagas, lo cual ha originado serios problemas tales como la generación de resistencia de insectos a los plaguicidas, la eliminación de la fauna benéfica, la contaminación de los ecosistemas y la presencia de residuos tóxicos en los alimentos. El control biológico mediante el uso de microorganismos entomopatógenos representa una alternativa de menor impacto ecológico para el manejo de insectos de importancia económica en la agricultura. Colombia, como país tropical, posee una gran diversidad de insectos plaga y benéficos, así como de entomopatógenos que contribuyen a la regulación de las poblaciones insectiles.

Entre los entomopatógenos más destacados se encuentra *Bacillus thuringiensis*, una bacteria Gram-positiva, esporulada nativa del suelo, caracterizada por la producción de cristales paraesporales compuestos por proteínas insecticidas (del inglés *Insecticidal Crystal Proteins* – ICP) denominadas delta-endotoxinas. La mezcla de esporas de ICP de varias cepas de *B. thuringiensis*, se han utilizado como principio activo de formulaciones comerciales que se han venido usando como bioinsecticidas para el control de insectos lepidópteros plaga en una amplia gama de cultivos agrícolas desde hace casi medio siglo. Actualmente, más del 90% de los bioplaguicidas comerciales a base de entomopatógenos son formulaciones basadas en *B. thuringiensis*. Y hoy día, se cultivan miles de hectáreas con plantas autorresistentes al ataque de insectos gracias a la clonación de los genes *cry* y su introducción en el genoma de las plantas.

Las ventajas del uso de bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* se derivan principalmente de su alta especificidad contra los insectos blanco y su inocuidad para el medio ambiente, la fauna benéfica y demás organismos vivos, incluyendo al hombre. Algunas de las desventajas del uso de bioinsecticidas comerciales a base de *B. thuringiensis* existentes actualmente en el mercado son su alto costo relativo, la pérdida de viabilidad de la bacteria por largos períodos de almacenamiento bajo condiciones inapropiadas y la rápida denaturación de la toxina en el medio ambiente. Además, su uso se ha limitado casi exclusivamente al control de insectos lepidópteros comedores de follaje, quedando otros grupos importantes de insectos plaga de los cultivos, como son insectos chupadores, minadores y barrenadores de las familias Lepidoptera, Díptera y Coleoptera, entre otros, fuera de su espectro de acción. La efectividad de las aspersiones de *B. thuringiensis* en el campo se ve también afectada por la cobertura de la aplicación, el tipo de formulación y la susceptibilidad al lavado por las aguas lluvias.

Dado que diferentes aislamientos de *B. thuringiensis* están provistos de una familia variable de proteínas insecticidas que difieren en su potencia y especificidad de huésped, se justifica la investigación de cepas nativas que posean toxinas novedosas o más efectivas para el control de insectos plaga de la agricultura, las cuales se puedan producir como bioinsecticidas de mayor efectividad y espectro de acción. Recientemente, cepas novedosas de *B. thuringiensis* han sido descubiertas con nuevas especificidades contra diversas familias de insectos e incluso nematodos, las cuales podrían extender el uso de este bacilo más allá de las aplicaciones de la agricultura.

Por las anteriores razones y contando con el patrocinio de la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano se inició un proyecto de investigación

tendiente al "Aislamiento y Caracterización de Cepas Nativas de *B. thuringiensis* para el Control de Plagas de la Agricultura" en Colombia. Actualmente, la UJTL cuenta con un Banco de Cepas Nativas de *B. thuringiensis* compuesto por más de 190 aislamientos procedentes de diversos ecosistemas o regiones geográficas, constituyéndose en una muestra bastante representativa, y por ende muy importante, de la variabilidad genética existente de este bacilo en el país. Es importante poder evaluar y conocer rápidamente el potencial que tienen los diversos aislamientos del Banco de Cepas Nativas de la UJTL, para ser utilizados por ejemplo en la producción de bioplaguicidas más efectivos o de mayor espectro de acción para el control de una mayor variedad de plagas agrícolas.

Aunque la actividad insecticida de una cepa de *B. thuringiensis* prácticamente solo se puede revelar mediante la realización de la prueba de toxicidad (ensayo biológico) con el insecto de interés, la realización de dichas pruebas es dispendiosa, demorada y costosa. La caracterización microscópica, bioquímica y molecular de las cepas, previa al ensayo biológico, permite clasificar y seleccionar las cepas con mayor potencial insecticida, de acuerdo con la presencia de genes *cry* específicos y su capacidad de producir cristales proteínicos tóxicos contra una determinada especie o familia de insecto de interés. De esta manera se puede reducir el número de cepas a evaluar mediante las pruebas finales de toxicidad. Además, se aumentan las probabilidades de poder identificar en menor tiempo cepas novedosas para el control de nuevas plagas (mayor espectro de acción) y/o cepas más tóxicas y ventajosas que las que se conocen y comercializan actualmente, las cuales pueden ser utilizadas en la producción de bioplaguicidas más efectivos o para la ingeniería genética de la resistencia a plagas en organismos transgénicos.

En el presente trabajo se estandarizaron metodologías para la caracterización microscópica, bioquímica, molecular y biológica de cepas nativas de *B. thuringiensis*; basadas en el estudio de la presencia, forma y cantidad de cristales y esporas y el análisis del perfil electroforético de proteínas totales de cultivos en fase estacionaria y de los productos de la amplificación de genes *cry* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las metodologías estandarizadas se emplearon para la caracterización de 192 aislamientos del Banco de Cepas Nativas de *B. thuringiensis* de la UJTL. La información obtenida permitió clasificar y seleccionar las cepas del Banco de acuerdo a su actividad biológica potencial para el control de *Tuta absoluta*, insecto plaga del tomate y también reconocer la presencia de proteínas novedosas con actividad biológica desconocida en algunas de las cepas.

Javier Hernández-Fernández
Julio de 2012

INTRODUCCIÓN

El tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill, es la hortaliza más importante para el planeta. Constituye el 30% de la producción hortícola, con aproximadamente cuatro millones de hectáreas sembradas y 107'972.098 toneladas de frutos cosechados en 2002 (FAO, 2003). En Colombia se cultivan variedades tipo "chonto" y "milano" correspondiendo al 80 y 20% de la producción nacional respectivamente (Vallejo, 1999). El cultivo de tomate en Colombia presenta problemas como bajo rendimiento y calidad, alta susceptibilidad a insectos plaga, enfermedades y condiciones adversas de clima y suelo, y altos costos de producción. La polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) es considerada una de las principales plagas endémicas de los países sudamericanos, ocasionando daños que se estiman del orden del 60 al 100% en aquellos cultivos sin protección contra esta plaga (Larraín, 1986; Giustolin *et al.*, 2001). El empleo de diversas combinaciones de insecticidas, y en dosis cada vez más crecientes, podría estar produciendo la aparición de insectos resistentes y adicionalmente la contaminación del producto y del ambiente. Existen pruebas acerca del desarrollo de resistencia a insecticidas clorados y fosforados, y piretroides (Salazar y Araya, 1997). Como alternativa al empleo de plaguicidas sintéticos, se ha dirigido la atención a microorganismos o productos microbianos secundarios biocontroladores de insectos. En este grupo se encuentra *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), este, es un bacilo entomopatógeno que se caracteriza por sintetizar una inclusión paraesporal de actividad insecticida compuesta de proteínas denominadas Cry con amplia variabilidad genética (Schnepf *et al.*, 1998). Existen más de 600 proteínas Cry, clasificadas en 67 grupos según el grado de divergencia evolutiva (Crickmore *et al.*, 2011). Estas proteínas presentan actividad biológica contra insectos plaga de los ordenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera y Malófaga, y otros, como nematodos y platelmintos, y ha mostrado actividad sobre células cancerígenas, leucémicas y contra protozoos de importancia medica como *Giardia lamblia* y *Plasmodium berghei* (Golberg & Margalit, 1977; Hofte & Whiteley, 1989; Beegle & Yamamoto, 1992; Feitelson *et al.*, 1992, 1993; Lorence, 1996; Schnepf *et al.*, 1998; Mizuki *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). La búsqueda de nuevos genes cry, que codifiquen toxinas con nuevas y/o mejores especificidades, es uno de los principales objetivos de los programas de investigación en *Bt*, debido al surgimiento de nuevos insectos plaga, y la aparición de resistencia (Cerdeña & Wright 2002, Schnepf *et al.*, 1998). Los productos a base de esporas y cristales de *Bt* constituyen entre el 1 y el 2% del mercado global de insecticidas que se estima en 8 billones de dólares por año (Nester *et al.*, 2002).

El propósito principal de este estudio fue aislar nuevas cepas de *Bt* a partir de muestras de suelo e insectos muertos en cultivos establecidos de tomate en: Cundinamarca (Susa y Chía), Boyacá (Villa de Leyva, Sutamarchán, Ráquira y Santa Sofía), Huila (Garzón) y Santander (Piedecuesta, Los Santos, Lebrija, Betulia, Floridablanca, Rionegro y Girón); y luego, caracterizarlos a nivel microscópico, bioquímico y molecular reconociendo los genes cry1 específicos y sus productos como un paso previo a la realización de bioensayos sobre la polilla del tomate.

Como resultados directos de este estudio se obtuvieron, tres tesis de pregrado: i) "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 (*Lycopersicum esculentum*)", ii) "Biodiversidad de genes insecticidas cry1, cry2, cry3 y cry4 en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas del ecosistema de manglar de la Ciénaga Grande de Santa Marta" y, iii) "Biodiversidad de genes de la familia cry1 con actividad antilepidóptera en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aislados del ecosistema manglar, Ciénaga Grande de Santa Marta Caribe colombiano"; dos artículos publicados: "Molecular and

biological characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains for controlling tomato leafminer (*Tuta absoluta* Meyrick) (Lepidoptera: *Gelechiidae*) in Colombia”, publicado en la revista *World Journal of Microbiological and Biotechnology*; y el artículo “Estandarización de un bioensayo y evaluación preliminar de tres formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: *Gelechiidae*)” publicado en la *Revista Colombiana de Biotecnología*. Los resultados parciales se presentaron en los encuentros: LXIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Congreso Colombiano de Biotecnología, II Seminario Internacional de Bionegocios, XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología (Quito, Ecuador) y en el XXXVII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología.

El tomate: descripción general

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), uno de los cultivos más importantes en Colombia, pertenece a la clase Angiospermae, subclase Dicotyledónea del orden Tubiflora y familia Solanaceae. Los tomates cultivados se agrupan dentro del subgénero *Eulycopersicom*, cuyos frutos cambian de color verde a rojo cuando maduran. Esta hortaliza presenta gran demanda en la dieta alimenticia y genera empleo e ingresos, no solo en el campo, sino también en la agroindustria. En el año 2000 se cultivaron en el país 15.000 ha de tomate, cuya producción ascendió a 450.000 t. Se han alcanzado producciones de hasta 272.000 t/12.500 ha con un rendimiento promedio de 22 t/ha. El promedio nacional está entre 15 y 20 t/ha y el óptimo nacional está en 40 t/ha. Las variedades más cultivadas son milano y chonto que crecen entre 600 y 1.200 msnm. El tomate participó con el 20% de la producción hortícola nacional entre 1991 y 1997. Los principales departamentos productores de tomate son Cundinamarca, Santander, Valle, Caldas, Huila, Risaralda, Antioquia, Atlántico y Guajira (Corporación Colombia Internacional, 2001) (Farias *et al.*, 2004).

Los insectos plaga que limitan severamente la producción de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill en Colombia son: el pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis*, el cogollero *Tuta absoluta*, la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* y *Liriomyza sp.* (Vallejo, 1999). *Tuta absoluta* es el insecto plaga más devastador en plantas de tomates *Lycopersicum esculentum* Mill en Suramérica (Suinaga *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2001), causando pérdidas entre 50 y 100% de los cultivos. Es una polilla pequeña que tiene distribución neotropical (Razuri & Vargas, 1975; Moore, 1983; Souza & Reis, 1986) e infecta hojas, frutos, flores y tallos de la planta. El daño es ocasionado cuando las larvas del insecto se alimentan del mesófilo de las hojas, haciendo minas y afectando la capacidad fotosintética de la planta, reduciendo la producción. Sin embargo, las larvas también pueden penetrar el fruto causando severas pérdidas (Colomo & Berta, 1995, en Pereira *et al.*, 2006).

Tuta absoluta Povolny, posee nombres sinónimos como: *Scrobipalpuloides absoluta* Povolny, *Gnorimoschema absoluta* Clarke, y *Phthorimaea absoluta* Meyrick.

Posee los nombres comunes: polilla del tomate, polilla perforadora, cogollero del tomate, gusano minador del tomate, minador de hojas y tallos de la papa, y pertenece a la clase *Insecta*, orden *Lepidoptera*, familia *Gelechiidae* (Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2005).

Tuta absoluta fue originariamente descrita como *Phthorimaea absoluta* (Meyrick, 1917). El género fue cambiado por *Gnorimoschema* (1962) y *Scrobipalpula* (1964). Esta especie fue más tarde clasificada en un nuevo género, *Scrobipalpuloides* (en 1987). El nombre correcto de la especie ahora es *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2005).

T. absoluta es un insecto olífago (Siqueira *et al.*, 2000) que se alimenta de plantas de la familia de las solanáceas. Otros cultivares, además del tomate que es su mayor planta hospedera, también son infestados por este lepidóptero (Vargas, 1970; Mallea *et al.*, 1972; Campos, 1976) dentro de estos, la papa, *Solanum tuberosum* L., berenjena, *S. melongena* L. y tabaco, *Nicotiana tabacum* L. Entre otras plantas silvestres se encuentran, *S. nigrum* L., *S. eleagnifolium* L., *S. bonariense* L., *S. sisymbriifolium* Lam., *S. saponaceum*, *Lycopersicum puberulum* Ph., *Datura ferox* L., *D. stramonium* L. y *Nicotiana glauca* (García & Espul, 1982). Sin embargo, es muy poco lo que se conoce sobre las relaciones tróficas entre *T. absoluta* y las plantas potenciales que invade; en Perú, por ejemplo, ha empezado a representar una seria amenaza en cultivos de papa (Campos, 1976; Cisneros & Mujica, 1998).

T. absoluta se distribuye en Suramérica, en Argentina (introducida desde Chile en 1964, de acuerdo a García & Espul, 1982), Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay, Venezuela. Pero no está presente en la región Andina a altitudes de más de 1000 msnm, como tampoco, a temperaturas bajas que son factores limitantes para su supervivencia (Notz, 1992). En 1962 se reportó *T. absoluta* infestando plantas de *Solanum lyratum*, en Japón, pero no existen reportes recientes de su presencia (Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2005). Mas recientemente (2006-2010) este insecto ha sido reportado en España, Argelia, Portugal, Marruecos, Italia, Inglaterra, Grecia, Libia, Bulgaria, Alemania y Albania, indicando que *T. absoluta* esta comenzando a convertirse en una plaga con consecuencias desconocidas.

Tuta absoluta posee un alto potencial reproductivo, pueden tener entre 10-12 generaciones por año. El ciclo biológico se completa en 29-38 días dependiendo de las condiciones ambientales; en Chile, por ejemplo, el desarrollo ha tomado hasta 76,3 días a 14°C; 39,8 a 19,7°C y 23,8 a 27,1°C (Barrios *et al.*, 1998). Los adultos son nocturnos y usualmente se esconden durante el día entre las hojas. Las hembras ponen sus huevos en partes aéreas sobre las plantas huéspedes, estas pueden poner cerca de 260 huevos durante su ciclo de vida. Producen 4 instares larvales. La pupación puede desarrollarse en el suelo, en la superficie de las hojas o formando minas, dependiendo de las condiciones ambientales (Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2005).

Para lograr obtener una producción sostenible de tomate, el agricultor está recurriendo a prácticas de control químico severas, utilizando mezclas de insecticidas altamente tóxicos, en dosis y frecuencias elevadas. Lo anterior está causando graves alteraciones en el ambiente, en la salud de quienes aplican estos productos y en la calidad de vida de los consumidores. El empleo de diversas combinaciones de insecticidas, y en dosis cada vez más crecientes, estaría provocando un incremento de la tasa de aparición de insectos resistentes. En efecto, existen antecedentes acerca del desarrollo de resistencia a insecticidas clorados y fosforados, e incluso hacia los piretroides deltametrina y esfenvalerato (Salazar y Araya, 1997). Como alternativa al empleo de plaguicidas sintéticos, se ha dirigido la atención a las propiedades insecticidas de ciertos microorganismos o productos microbianos secundarios. El mayor número de especies con propiedades insecticidas pertenece al género *Bacillus*, en especial a la especie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Theoduloz *et al.*, 2003). En Chile en el año 2006, se reportó un trabajo en el que se analizaron cepas nativas de *Bt* y se encontraron dos cepas que contenían genes *cry1* con alta toxicidad sobre larvas de primer instar de *Tuta absoluta* (Niedmann & Meza-Basso, 2006).

***Bacillus thuringiensis*: la bacteria insecticida**

B. thuringiensis pertenece al phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, Grupo I del género *Bacillus*. Dentro de este grupo se encuentran las especies: *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, las cuales presentan una relación filogenética muy estrecha con *B. thuringiensis* (Garrity *et al.*, 2004). Los miembros del género *Bacillus* son bacterias Gram-positivas, aerobias facultativas y móviles (Holt *et al.*, 2000).

Una de las características más importantes de *B. thuringiensis* es la de sintetizar durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento, una inclusión paraesporal de naturaleza proteica (ICP) denominada inclusión cristalina, cristal o δ -endotoxina (Schnepf *et al.*, 1998). La estructura de esta inclusión es el resultado del ensamblaje de varias unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, que oscilan entre 27 y 140 kilodaltons (kDa), las cuales le dan la forma característica (Hofte & Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998). Se pueden observar cristales con muy variada morfología, entre ellas bipiramidal, cuboidal, oval, cuadrada, rectangular, circular y amorfa (Agaisse *et al.*, 1995). El tipo de morfología de los cristales tiene importancia, puesto que esta se ha relacionado con la actividad tóxica de los aislamientos de *B. thuringiensis* (De Maagd *et al.*, 2003).



Figura 1. Observación de un cultivo esporulado de *B. thuringiensis*, al microscopio óptico de contraste de fase. Se aprecian las esporas ovals y los cristales bipiramidales.

B. thuringiensis es un patógeno de insectos y su actividad es atribuida, amplia o completamente (dependiendo del insecto), a las ICP y su importancia radica en su toxicidad contra larvas de insectos plaga de los órdenes lepidóptera, coleóptera, díptera, himenóptera, homóptera, ortóptera, y malófaga, y aun en otros organismos tales como platelmintos, nematodos, protozoos y ácaros (Hofte & Whiteley, 1989; Feitelson *et al.*, 1992, 1993; Bravo *et al.*, 1992, 1998; García-Robles *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2004). Incluso han mostrado actividad sobre células cancerígenas (Mizuki *et al.*, 1999; Kitada *et al.*, 2006).

B. thuringiensis es la bacteria entomopatógena más ampliamente utilizada como biopesticida, sola o en combinación con pesticidas químicos, en la protección de especies vegetales, agricultura comercial y contra dípteros vectores de enfermedades humanas como malaria, dengue hemorrágico, fiebre amarilla y filariasis (Nester *et al.*, 2002).

Desde el año 1981, se han clonado, secuenciado y caracterizado numerosos genes *cry1*, por lo cual se ha establecido una clasificación con base en la secuencia primaria de la proteína (Crickmore *et al.*, 2011).

B. thuringiensis presenta una amplia distribución en el ambiente, lo cual se puede explicar por la propiedad que tiene la bacteria de permanecer en forma de spora por períodos de tiempos muy largos en ausencia de humedad y nutrientes. A su vez, cuando la spora se encuentra en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios puede comenzar de nuevo su crecimiento vegetativo (Martín & Travers, 1989; Holt *et al.*, 2000). La diversidad de las cepas y toxinas de *B. thuringiensis* se debe a su alto grado de plasticidad genética. Las subespecies de *B. thuringiensis* se han clasificado en 71 serotipos.

B. thuringiensis es considerada una bacteria ubicua puesto que se ha aislado de diferentes partes del mundo y de muy diversos sistemas como: suelo (Martín & Travers, 1989; Arango *et al.*, 2002; Uribe *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2010); insectos muertos o enfermos y sus hábitats (Itoua-Apoyalo *et al.*, 1995; Bernhard *et al.*, 1997); polvo de productos almacenados (Meadows *et al.*, 1992; Hongyu *et al.*, 2000); hojas (Meadows *et al.*, 1992; Maduell *et al.*, 2002); y otras fuentes naturales (Hegelson *et al.*, 1998). También ha sido aislada de heces fecales de animales (Lee *et al.*, 2003). Del mismo modo, *B. thuringiensis* posee la capacidad de ocupar ecosistemas acuáticos y diferentes ecosistemas terrestres como desiertos, estepas, bosque húmedo tropical, altas montañas, playas y cuevas, entre muchos otros (Schnepf *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2000; Martínez & Caballero, 2002).

En la naturaleza existe una gran diversidad de genes *cry*, la cual se puede explicar mediante la movilización del ADN que se favorece ya sea por conjugación, transposición y/o una posible recombinación entre genes cercanos (Carlson *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2000; Rasko *et al.*, 2005). Gran parte de las cepas de *B. thuringiensis* son multigénicas, portando entre 2 y 12 genes *cry* diferentes, los cuales generalmente se han reportado en distintos plásmidos conjugativos de alto peso molecular al interior de una misma cepa (Jarret, 1983; Kronstad *et al.*, 1983, Vilas-Bôas, 1998).

La toxina Cry logra su efecto formando poros líticos sobre las células del intestino medio del insecto susceptible. Una vez el insecto susceptible ingiere el cristal, este se solubiliza en el ambiente alcalino y reductor del intestino medio. Como la mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, estas son activadas por acción de las proteasas (tripsina, quimiotripsina, termolisina y catepsinas) del intestino medio de los insectos (Bravo *et al.*, 2002). Luego, las proteínas activas se unen a sitios específicos localizados en las microvellosidades apicales del intestino medio. La unión a estos sitios es la etapa determinante de la alta especificidad de las δ -endotoxinas; este proceso consta de dos pasos en el que se envuelve una interacción reversible, seguido por la interacción irreversible. Se ha propuesto que la interacción inicial se realiza entre un carbohidrato del receptor y la proteína, mientras que la unión irreversible se asocia con una interacción proteína-proteína. Se han implicado como receptores putativos diferentes aminopeptidasas y proteínas similares a las Cadherinas (Rukmini *et al.*, 2000; Aronson y Shai, 2001).

Posteriormente, cuando la toxina se encuentra activa se inserta en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional drástico disparado por el receptor y forma poros los cuales al-

teran el equilibrio de electrólitos y agua, interfiriendo en el metabolismo celular normal. Diversos estudios han encontrado que las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical tanto para cationes monovalentes como para divalentes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez que colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma; obteniendo como consecuencia la alcalinización de este último y la destrucción de las células columnares y caliciformes (de Maagd *et al.*, 2001). Al destruirse las células, las esporas de *B. thuringiensis* van a tener acceso a la hemolinfa y proliferan dentro de esta (Van Rie *et al.*, 1990; Knowles, 1994; de Maagd *et al.*, 2001); provocando en la larva del insecto parálisis de su tracto digestivo, cese de la ingesta y por último su muerte (Schnepf *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 2005).

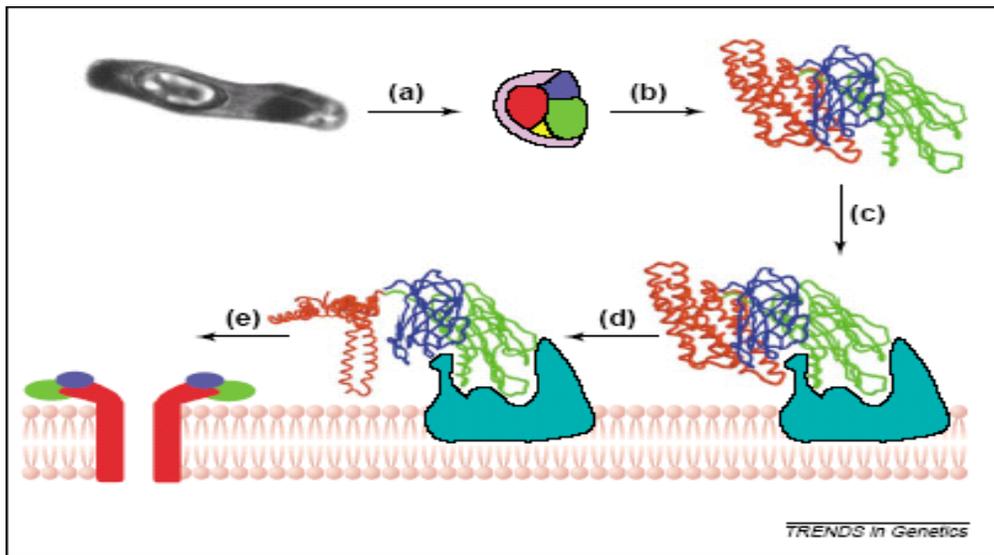


Figura 2. Mecanismo de acción de la toxina Cry. a) Después de la ingestión por el insecto, el cristal se solubiliza en el jugo intestinal, b) Proteasas intestinales cortan el extremo C-terminal, c) La toxina activada se une al receptor en la membrana celular, d) La reestructuración permite a las horquillas de dos hélices insertarse en la membrana, e) La toxina forma un poro (de Maagd *et al.*, 2001).

Además de las δ - endotoxinas, *B. thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a insectos plaga susceptibles con mayor eficiencia. Sin embargo, a nivel comercial no se les ha establecido su potencial insecticida. Entre estos factores de virulencia se encuentran: las β -exotoxinas, quitinasas, y las proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento (del inglés *Vegetative Insecticidal Proteins* – VIP) (Lovgren *et al.*, 1998; Sampson & Goodey, 1998; Wiwat *et al.*, 2000; Pena *et al.*, 2006).

β -exotoxinas

Son conocidas como thuringiensinas, son toxinas no proteínicas, termoestables de naturaleza nucleotídica (Ohba *et al.*, 1980). Estas toxinas son inespecíficas, por tanto pueden tener efectos

sobre diferentes tipos de organismos (Ohba *et al.*, 1980). Principalmente son activas sobre insectos dípteros, aunque pueden tener acción tóxica sobre insectos coleópteros, lepidópteros y algunas especies de nematodos (Ohba *et al.*, 1980). Su mecanismo de acción no está bien definido; sin embargo, esta toxina al ser análoga del nucleótido adenina, se ha encontrado que interfiere con la ARN polimerasa dependiente del ADN, inhibiendo la síntesis de ARN al competir con el ATP por sitios de unión, afectando la muda, la pupación del insecto y causando efectos teratológicos a dosis subletales (Levinson *et al.*, 1990; Bravo *et al.*, 2004).

La β -exotoxina I presenta toxicidad contra células de mamíferos y es muy persistente en el ambiente. En 1999, fue excluida del uso público por la Organización Mundial de la Salud (OMS); sin embargo, se ha utilizado en preparaciones de β -exotoxina (Muscabac®; Farnos Group, Ovlunsalo Finland; Bitoxibacilli®; Mikrobioprom, Moscú, Rusia) para el control de larvas de moscas, cuando estas presentan resistencia a insecticidas químicos en dosis que no afecten a los vertebrados (Calberg, 1986).

Quitinasas

A nivel genético se han clonado y secuenciado muy pocos genes. Sin embargo, Liu *et al.* (2002) reportaron que *B. thuringiensis* puede producir enzimas quitinolíticas y algunas de estas pueden potenciar su acción insecticida, aunque aún no se ha demostrado cuantitativamente el efecto sinérgico entre las quitinasas y las proteínas Cry purificadas (Liu *et al.*, 2002; Barboza-Corona *et al.*, 2003; Thamthiankul *et al.*, 2004; Lin & Guan, 2004).

Proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento (VIP)

Son las proteínas que se secretan durante la fase vegetativa del crecimiento y no exhiben ninguna similaridad con las δ -endotoxinas, no forman cristales paraesporales (Estruch *et al.*, 1996; Selvapandiyar *et al.*, 2001). Producen lisis de las células epiteliales del intestino medio y parálisis del tracto gastrointestinal en insectos susceptibles, aunque se ha observado que presentan receptores diferentes a los de las proteínas Cry (Estruch *et al.*, 1996; Selvapandiyar *et al.*, 2001; Doss *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003).

Hasta el momento se han descrito 3 familias diferentes: VIP1A, VIP2A y VIP3A. Estas presentan toxicidad específica hacia insectos del orden lepidóptera, entre los que se destacan *S. frugiperda*, *S. exigua*, *Agrotis ipsilon* y *Helicoperva zea* (Donovan *et al.*, 2001; Crickmore, 2006).

BIOTECNOLOGÍA DE *B. thuringiensis*

Desarrollo de biopesticidas con base en *B. thuringiensis*

B. thuringiensis constituye del 1 al 2% del mercado global de insecticidas, estimándose en 8 billones de dólares por año (Nester *et al.*, 2002). Se han venido desarrollando y aplicando bioinsecticidas formulados con *B. thuringiensis*, los cuales se producen con cepas nativas y una pequeña fracción de las proteínas Cry conocidas (Bravo *et al.*, 2004). Con manipulación genética se crean combinaciones de los genes más usados con efectos deseables (Schnepf *et al.*, 1998).

Los bioinsecticidas con base en *B. thuringiensis* se clasifican en productos de primera generación (esporas y cristales), segunda generación (esporas y toxinas de cepas con introducción de genes de δ -endotoxina de otras cepas), tercera generación (bacterias recombinantes muertas, especialmente *Pseudomonas fluorescens*) y cuarta generación (quimeras de proteínas) (Bravo *et al.*, 2004).

Estos biopesticidas muestran beneficios en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) por su bajo desarrollo de resistencia, las políticas nacionales sobre el uso de insecticidas convencionales y los altos costos de desarrollo de nuevos insecticidas sintéticos; pero su uso es limitado, debido a su estrecho rango de hospedero, baja persistencia sobre las plantas y su incapacidad de atacar los insectos chupadores con su aplicación (Bravo *et al.*, 2004).

Estos inconvenientes se han solucionado con el uso de cepas que portan más de un gen *cry* y con la introducción de estos genes en bacterias recombinantes de vida endofítica como *Clavibacter xyli*, *B. cereus* y *B. megaterium*, puesto que estas pueden propagarse a sí mismas en el sitio de alimentación y continuar produciendo las proteínas Cry en el campo (Turner *et al.*, 1991). También se han empleado las bacterias que crecen en la zona de la rizosfera, como: *B. subtilis*, *Ps. fluorescens* y *A. tumefaciens* (Waalwijk *et al.*, 1991; Nester *et al.*, 2002).

Plantas – *B. thuringiensis*

Actualmente, mediante la manipulación genética de los genes *cry* de *B. thuringiensis* se ha dado lugar a la generación de plantas transgénicas y la introducción de los mismos en diversos grupos de bacterias (Nester *et al.*, 2002). Este tipo de manipulación tiene como propósito contribuir en el mejoramiento de la productividad de los cultivos, mediante la superación de algunos problemas con respecto a la aplicación en campo de biopesticidas con base en *B. thuringiensis* y a su vez, se pretende mejorar y simplificar el control de plagas que afectan los cultivos, ya sea disminuyendo el uso de insecticidas convencionales o mejorando la eficacia de otros métodos de biocontrol (Crickmore, 2006).

Una de las aplicaciones más tempranas en la protección de cultivos se inició en 1987, cuando se desarrollaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) resistentes a larvas de primer instar de *Manduca sexta*, en las cuales se usaron genes *cry* derivados de cepas nativas de *B. thuringiensis* (Barton *et al.*, 1987). Estas plantas presentaron niveles bajos de expresión debido a la poliadenilación temprana del ARN mensajero y se mejoró la expresión cuando la transformación genética involucró la inserción de versiones sintéticas de estos genes, adaptando las secuencias nucleotídicas a los

ENSAYOS BIOLÓGICOS CON *B. thuringiensis*

Frecuentemente se utiliza el bioensayo como única vía para evaluar el efecto letal producido por los microorganismos, en el cual la cantidad de agente microbiano requerido para producir la mortalidad deseada está en función de la susceptibilidad del huésped y patogenicidad del microorganismo (Martínez, 2004). Para *B. thuringiensis*, la potencia del agente activo se mide sobre un estado específico del organismo potencialmente susceptible, para lo cual se aplica una metodología que permite evaluar la actividad tóxica de una cepa, producto activo u organismo recombinante, sin que los resultados se vean afectados por las variaciones propias de los sistemas biológicos (Martínez, 2004).

Ensayos biológicos con cepas o productos convencionales

Dietas artificiales

Una dieta (o sustrato alimenticio) es la herramienta básica que permite estimar la actividad de una cepa microbiana y a su vez provee un procedimiento rápido, estandarizado y simple (Navon, 2000). Las dietas pueden ser naturales si implica la utilización de los mismos materiales que el insecto consume en campo; artificiales si los componentes naturales son suplementados con otro tipo de nutrientes que se supone suplen las necesidades de la plaga o son remplazados totalmente por materiales diferentes a los naturales; artificiales merídicas si incluyen a la vez elementos de composición conocida (ácido ascórbico, vitaminas, colesterol, entre otras) y desconocida (harinas, levaduras, aceites, entre otras); y oligídicas si tienen elementos de composición desconocida o materiales crudos (Martínez, 2004).

Forma de aplicación

La inclusión del producto microbiano en la dieta del insecto puede hacerse de varias formas, una de ellas es mezclarlo con el agua de preparación de la dieta, o contaminar superficialmente el medio, el producto se esparce y se deja secar. Otra manera puede ser agregando de 1 a 5 μL de la muestra a evaluar, la cual puede llevar un atrayente (generalmente sacarosa), o simplemente contaminar el alimento natural (hojas, tubérculos o tallos) con la suspensión de la muestra por aspersión, barnizado o inmersión. En dípteros se utiliza la mezcla del ingrediente activo con el agua donde se colocarán las larvas; en insectos de instares avanzados se puede inyectar directamente el producto en el tracto digestivo por vía oral (Martínez, 2004).

Dosis

El producto bacteriano (esporas, cristales, protoxinas, toxinas activadas u otros) debe ser cuantificado previamente a la realización del bioensayo (Martínez, 2004). En general, la evaluación se realiza con pruebas que consisten en amplios rangos de concentración de producto activo y un control que puede hacerse con agua o soluciones tampón (Martínez, 2004).

Insecto

La selección del insecto problema depende del impacto que tenga ya sea en la economía o salud y de las actividades biológicas reportadas para la bacteria. Los insectos se pueden obtener directamente de campo o de crías en laboratorio (Martínez, 2004).

Los ensayos biológicos se realizan comúnmente sobre larvas de primer o segundo instar, puesto que son los estados más susceptibles del insecto, dando una respuesta más exacta del nivel de actividad de la cepa bacteriana. Generalmente son los instares a controlar en campo, están disponibles en un número más grande que otros instares, el período de bioensayo es corto y la precisión es más alta, puesto que la mortalidad es uniforme y los intervalos de confianza son más pequeños (Navon, 2000). Para evaluar efectos a largo plazo y daños intestinales se pueden utilizar instares avanzados (Navon, 2000). Es conveniente monitorear el peso, tamaño y describir el instar larval, se deben utilizar neonatos de 0 a 12 horas de eclosionados y con privación de alimento, la mortalidad es evaluada entre 48 y 96 horas (Navon, 2000; Martínez, 2004).

Diseño experimental y análisis estadístico en bioensayos

El diseño más empleado es el completamente aleatorizado, cuando la variabilidad natural no tiene ninguna tendencia clara, también se utiliza el de bloques completamente aleatorizados cuando existe una variable con una tendencia clara (Navon, 2000; Martínez, 2004). Se considera que 25 es el número mínimo de larvas a emplear por concentración con mínimo 3 repeticiones (Navon, 2000; Martínez, 2004). Los ensayos biológicos deben repetirse 4 veces en días diferentes para corregir variaciones dadas por calidad del insecto, condiciones locales o procedimientos experimentales (Navon, 2000; Martínez, 2004). La respuesta más fácil de evaluar en un bioensayo es el porcentaje de mortalidad (Navon, 2000; Martínez, 2004). La expresión más empleada de la actividad tóxica es la Concentración Letal 50 (CL50), parámetro que indica la concentración a la cual se origina la muerte del 50% de la población de los insectos evaluados (Navon, 2000; Martínez, 2004).

LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Genes codificantes de proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), fue ideada originalmente por Kleppe *et al.* (1971). Posteriormente, la técnica fue concebida independientemente por Mullis (Saiki *et al.*, 1988). La PCR consiste en la amplificación exponencial de fragmentos específicos de ADN por una enzima polimerasa involucrando dos oligonucleótidos, los cuales se hibridan con zonas homólogas de ADN molde sirviendo para la reacción de síntesis, y con base en esto determinar su presencia o ausencia. Esta técnica se ha utilizado para la investigación y/o el secuenciamiento de genomas totales, estudios moleculares de evolución y descubrimiento de nuevos genes, entre otros (Porcar & Juárez-Pérez, 2003).

En el caso de *B. thuringiensis*, la identificación de los genes codificantes para δ -endotoxinas por PCR, ha demostrado ser una metodología muy útil y sensible, la cual permite entrever su posible actividad biológica evitando así tener que desarrollar múltiples bioensayos; la presencia de regiones conservadas y variables en la secuencia de los genes *cry* ha facilitado el reconocimiento de familias y subfamilias que poseen generalmente el mismo espectro insecticida (Porcar & Juárez-Pérez, 2003). Esta aplicación de la PCR fue iniciada por Carozzi *et al.* (1991), quienes emplearon un grupo de 12 oligonucleótidos que amplificaban 3 familias de genes *cry* principales: *cry1*, *cry3*, y *cry4* y así identificar aislamientos antilepidópteros, anticoleópteros y antidípteros, respectivamente.

La estrategia más usada para la caracterización de grandes colecciones de cepas ha sido PCR múltiple, donde se diseñan pares de oligonucleótidos específicos para los bloques conservados de las diferentes familias de genes *cry*. Después, se realiza una segunda reacción de PCR donde se utilizan oligonucleótidos específicos para las regiones variables de cada gen identificado en la primera reacción y así ubicar la subfamilia a la que pertenece (Bourque *et al.*, 1993; Cerón *et al.*, 1994, 1995; Ben-Dov *et al.*, 1997). Después, se describió una modificación de esta metodología, en la cual se utilizó una combinación de oligonucleótidos universales y específicos degenerados (Berón *et al.*, 2005).

Quizás uno de los objetivos más grandes que persigue la caracterización de esta bacteria es la búsqueda de nuevos genes que codifiquen proteínas de mayor potencia insecticida o con nuevos espectros de acción (Porcar & Juárez-Pérez, 2003). Cerón *et al.* (1995), describieron un posible nuevo gen con la técnica de PCR múltiple pero nunca lo secuenciaron. En 1993, Kalman *et al.* propusieron: PCR caminante, para identificar nuevos genes del tipo *cry1C* con el diseño de oligonucleótidos para toda la secuencia de *cry1Ca1*, se podría estar ante un nuevo gen si en un momento dado no se presentaba amplificación de una región en específico o se presentaba un producto de un tamaño diferente al esperado; con esta estrategia se detectó el gen *cry1Cb1*.

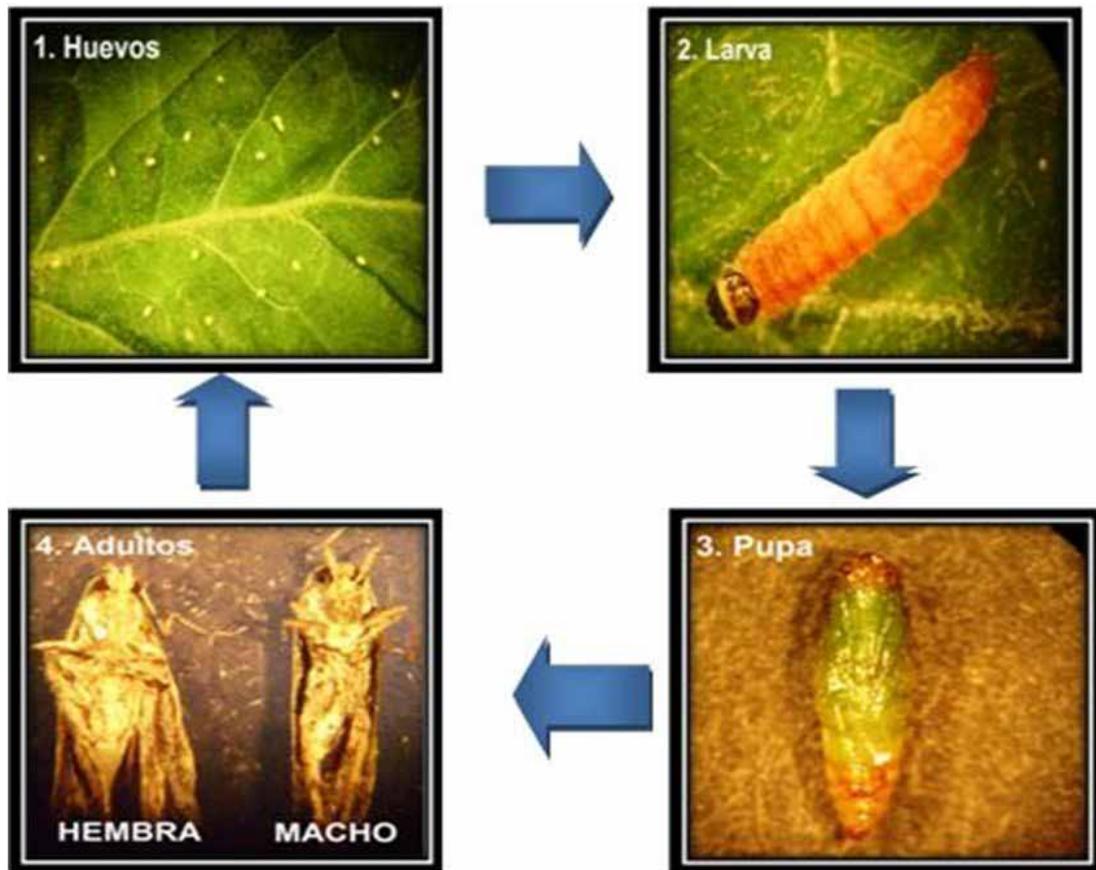


Figura 3. Ciclo biológico de *Tuta absoluta*.

1. Los huevos son de forma elíptica, de color blanco recién ovipositados, luego se tornan amarillo o amarillo naranja al aproximarse su eclosión. Son depositados en forma individual sobre la planta. 2. La larva emerge del huevo y busca un punto de entrada, consume el mesófilo y deja áreas traslucidas conocidas como galerías; pasa por cuatro estadios larvales, cambiando de color blanco, verde, gris, rojo. 3. En estado de prepupa la larva elabora un capullo, empupando en el suelo. 4. Los adultos son mariposas que miden aproximadamente 6 mm de longitud, los machos tienen un abdomen gris claro y delgado mientras que las hembras presentan un abdomen de color blanco crema y más ancho que el de los machos.

Otra metodología utilizada para la búsqueda de nuevos genes es PCR-RFLP (combinación de PCR y Polimorfismos en Longitud de Fragmentos de Restricción). Aquí se amplifica, con un grupo específico de oligonucleótidos, y luego los productos de PCR se cortan con enzimas de restricción. Si un fragmento de esta digestión es diferente al esperado debido a la ausencia o presencia de un sitio de restricción dado, dicho fragmento puede clonarse y secuenciarse para luego usarse como sonda dirigida hacia todo el gen observando su nivel de hibridación, si este es bajo, se secuencia para confirmar la presencia de un nuevo gen (Kuo & Chak, 1996). En China se detectó un nuevo gen tipo *cry1A* utilizando esta técnica (Wang *et al.*, 2003). También, Song *et al.* (2003) identificaron un nuevo gen *cry1le1* utilizando PCR-RFLP.

Con el mismo objetivo también se ha desarrollado otra variante de la PCR denominada PCR por exclusión (E-PCR, por sus siglas en inglés: exclusive PCR). Se basa en el uso de 2 reacciones de

PCR utilizando oligonucleótidos universales y específicos. La segunda amplificación solo ocurre si existe un nuevo gen. El uso de oligonucleótidos universales degenerados aumentó la probabilidad de amplificación de secuencias de baja homología dentro de la familia del gen (Juárez-Pérez *et al.*, 1997).

Recientemente se ha descrito una nueva estrategia para la búsqueda de nuevos genes *cry*, utilizando la técnica de microarreglos, en la cual se diseñaron diferentes sondas específicas de tamaño pequeño las cuales producían patrones de hibridación que permitían la discriminación rápida de genes específicos. Con este método se detectaron principalmente secuencias conocidas del gen *cry1* y se sugirió un futuro uso en la evaluación de la expresión del gen (Letowski *et al.*, 2005).

También han sido empleadas sondas para la detección y caracterización de nuevos genes *cry*, las cuales consisten en dos mezclas de sondas que se usan en dos reacciones de hibridación diferentes; la primera reacción involucra sondas dirigidas hacia las regiones conservadas de las subfamilias escogidas y la segunda reacción se realiza con sondas para regiones variables conducida en condiciones de baja astringencia, si se encuentran bajos niveles de hibridación se podría reconocer el nuevo gen (Beard *et al.*, 2001). Sin embargo, a medida que aumentan los genes *cry* descritos con alta similitud, la técnica ha sido menos eficiente para caracterizar un gran número de cepas de *B. thuringiensis* (Masson *et al.*, 1998; Beard *et al.*, 2001).

Además, la PCR ha sido utilizada para estudios de variabilidad genética en especies de *B. thuringiensis* dentro de grandes colecciones. Se destaca la PCR que utiliza secuencias repetitivas de ADN como REP (palindrómico extragenético repetitivo) y ERIC (consenso intergenético repetitivo interbacteriano) (Bravo *et al.*, 1998; Beard *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2002; Porcar & Juárez-Pérez, 2003; Tounsi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Reyes-Ramírez & Ibarra, 2005).

