



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

**Caracterización de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217
de *Bacillus thuringiensis* con toxicidad hacia
larvas del mosquito *Aedes aegypti*.**

TESIS QUE PRESENTA

ING. EN AGROTECNOLOGÍA MARIANA FERNÁNDEZ NAVARRO

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE EUGENIO IBARRA RENDÓN

IRAPUATO, GTO.

SEPTIEMBRE 2016

**El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de
Bioinsecticidas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica
del Centro de investigación y Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional Unidad Irapuato bajo la dirección del Dr.
Jorge E. Ibarra Rendón.**

DEDICATORIA

A mis padres Juana Navarro y J Guadalupe Fernández que desde siempre me han apoyado, porque gracias a su amor, esfuerzo y sacrificio he seguido adelante. Por todas las enseñanzas.

A mis hermanos Paco, Martin, Erika, Karina y Lupita por su cariño y apoyo que siempre me han brindado, porque han sido mi fortaleza.

A mis pequeños sobrinos Camila, Panchito, Tadeo, Netin, Ángel y Nathy por convertir esos momentos difíciles en alegrías y darme la energía para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca que hizo posible mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) I.P.N. Unidad Irapuato, por haberme dado todas las facilidades para llevar a cabo mis estudios.

Al Dr. Jorge E. Ibarra Rendón, por haberme aceptado en su laboratorio, por el tiempo, la paciencia y dedicación en la realización del trabajo de tesis.

A la Dra. Ma. Cristina del Rincón, por sus observaciones durante el desarrollo del trabajo y por sus correcciones al escrito final.

Al Dr. Reynaldo Ariel Álvarez Morales, por sus observaciones y por su disposición para formar parte del comité evaluador.

Al Dr. Miguel Ángel Salas Marina por el apoyo que me brindo cuando llegue al laboratorio, por todas las enseñanzas, por su amistad.

Al Ing. Javier Luévano Borroel por la asistencia prestada en el uso de equipos y el material biológico para la realización de los bioensayos.

A la M.C Elia Regina Basurto Ríos, por el apoyo brindado en el trabajo de laboratorio, por su amistad.

Al M. en B. Leandro Gabriel Ordoñez Acevedo, por el apoyo técnico y sugerencias para la realización de la técnica de PCR.

A mis cuñadas Cristina y Karina por los buenos momentos y ratos agradables.

A mis compañeros Yari, Nadin y Juve por el apoyo en la realización de este proyecto.

A Arlet por apoyarme en el análisis de las secuencias que se encuentran en el proyecto.

A Rossy por todo el apoyo que me ha brindado durante todo el transcurso de la maestría, por su amistad, por tanto, Gracias Rossy.

Al escuadrón tesoro (Dalí Alma Rossy, Yoli e Ismael) por su amistad, el apoyo y su ayuda en las clases.

A mis compañeros de generación Dalí Alma Rossy, Yoli, Ismael, Cristal, Arlet y Carlos, por las convivencias y los ratos agradables.

A mis compañeros del Laboratorio de bioinsecticidas e insectario: Migue, Ansonny, Yari, Nadin, Juventino, Magy, Javier, Katy, Paco, Luis y Rossy.

A Dora Elia Anguiano, por atender todas mis peticiones y trámites de la manera más eficiente.

A todo el personal que labora dentro del CINVESTAV por realizar muy bien su trabajo y con esto facilitar la culminación de mi posgrado.

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	II
Resumen	III
Abstract	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.2 Breve historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.3 Cristales parasporales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.4 Mecanismo de acción de δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.5 Estructura de las proteínas Cry	7
2.6 Caracterización de variedades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
2.6.1 Caracterización morfológica de los cristales parasporales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.6.2 Serotipificación	10
2.6.3 Patrón de Plásmidos	11
2.6.4 Secuenciación de los genes de la flagelina	12
2.6.5 Secuenciación de los genes codificantes de las δ -endotoxinas.	12
2.7 Usos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.8 <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> como agente de control biológico.	14
2.9 Vectores y enfermedades que transmiten	16
2.9.1 El dengue y su situación en el mundo	16
2.9.2 El dengue: Situación Nacional	17
3. JUSTIFICACIÓN	19

4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo General	20
5.2 Objetivos Específicos	20
6. METODOLOGÍA	21
6.1 Cepas empleadas	21
6.2 Mantenimiento de <i>Aedes aegypti</i>	21
6.3 Preparación del complejo Espora-Cristal de <i>B. thuringiensis</i>	22
6.4 Purificación de cristales paraesporales.....	22
6.5 Bioensayos en <i>Aedes aegypti</i>	23
6.5.1 Bioensayos Cualitativos.....	23
6.5.2 Bioensayos Cuantitativos.....	23
6.6 Microscopía de las cepas seleccionadas	24
6.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	25
6.8 Extracción de DNA plasmidico de <i>B. thuringiensis</i>	27
6.9 Análisis del DNA plasmídico de <i>B. thuringiensis</i>	28
6.10 Extracción de DNA total de <i>B. thuringiensis</i>	29
6.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	29
6.11.1 Genes de la flagelina	29
6.11.2 Genes codificantes de proteínas Cry y Cyt.....	30
6.12 Análisis del DNA Total de <i>B. thuringiensis</i> y amplicones	31
6.13 Aislamiento de DNA de geles de agarosa.....	31
6.14. Secuenciación.....	32
7. RESULTADOS	33

7.1 Actividad mosquitocida de <i>B. thuringiensis</i>	33
7.1.1 Selección de las cepas de mosquitocidas de <i>B. thuringiensis</i>	33
7.1.2 Determinación de las concentraciones letales medias (CL ₅₀).....	34
7.1.3 Determinación del sinergismo de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 con la toxina Cyt1Aa.	36
7.2 Caracterización de los cristales parasporales de las cepas mosquitocidas .	38
7.2.1 Composición proteica de los cristales parasporales	38
7.3 Identificación de genes codificantes de δ-ENDOTOXINA.....	39
7.3.1 Amplificación de los genes <i>cry</i>	39
7.3.2 Amplificación de los genes <i>cyt</i>	40
7.3.3 Secuenciación de los productos de PCR.....	41
7.4 Caracterización molecular de las cepas mosquitocidas LBIT-980 y LBIT-1217	41
7.4.1 Secuenciación de los genes de la flagelina de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217	41
7.4.2 Análisis del patrón de plásmidos de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 ..	43
7.4.3 Análisis de los cristales de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 por microscopía electrónica de barrido	43
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES.....	51
10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	52
11. BIBLIOGRAFÍA.....	53
12. APENDICE.....	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis berliner</i> 1715 durante el proceso de esporulación.....	4
Figura 2. Mecanismo de acción de las de las proteínas entomopatógenas de <i>Bt</i> ...	8
Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína Cry1Aa	9
Figura 4. Panorama de dengue en el mundo, 2010	18
Figura 5. Panorama de casos de dengue en México por año, de 2000-2014.	18
Figura 6. Purificación de los cristales paraesporales	36
Figura 7. Análisis estadístico de la mezcla de toxinas LBIT-980/Cyt1Aa	37
Figura 8. Análisis estadístico de la mezcla de toxinas LBIT-1217/Cyt1Aa	38
Figura 9. SDS-PAGE de cristales puros de cepas mosquitocidas.	39
Figura 10. Amplificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 .	40
Figura 11. Alineación de secuencia múltiple del amplicón de los genes <i>cry</i> conservados.....	41
Figura 12. Amplificación de la subunidad <i>hag</i> de la flagelina de <i>B. thuringiensis</i> en un gel de agarosa.....	42
Figura 13. Análisis del amplicón de la subunidad <i>hag</i> de la flagelina de <i>B. thuringiensis</i>	43
Figura 14. Patrón de plásmidos de las cepas mosquitocidas de <i>B. thuringiensis</i> en un gel de agarosa.....	44
Figura 15. Microscopia electrónica de barrido de las cepas mosquitocida de <i>B. thuringiensis</i>	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación por PCR.	30
Tabla 2. Condiciones utilizadas para la amplificación por PCR.....	31
Tabla 3. Actividad mosquitocida de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217.....	35
Tabla 4. Actividad mosquitocida de las cepas reportadas.....	35

Resumen

Bacillus thuringiensis serovar *israelensis* (Bti) y *Lysinibacillus sphaericus* han sido utilizadas con éxito para controlar las poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades. Sin embargo, la posibilidad de encontrar nuevas proteínas con actividad mosquitocida, sigue siendo factible e interesante.

En este trabajo se seleccionaron dos cepas de *Bacillus thuringiensis* que en bioensayos preliminares mostraron actividad hacia larvas de *Aedes aegypti*: la cepa LBIT-980 perteneciente al serovar *kim* se aisló del suelo y LBIT-1217 fue aislado de lombricomposta. LBIT-980 mostró un cristal en forma de esfera colapsada que contiene la proteína Cry59Aa, mientras que LBIT-1217 mostró una morfología típica de cristal bipiramidal y un 76% de identidad con la proteína Cry1C.

Se realizaron bioensayos cuantitativos siguiendo el procedimiento estándar y utilizando larvas de *Aedes aegypti* de cuarto instar para determinar la concentración letal media o CL₅₀. Cuando se utilizó el complejo espora-cristal, la CL₅₀ fue de 6.53 µg/mL y 13.42 µg/mL para LBIT-980 y LBIT-1217 respectivamente, mientras que con la aplicación de cristales puros la CL₅₀ fue de 2.85 µg/mL y 3.99 µg/mL. Aunque estos niveles de toxicidad son inferiores a los mostrados por Bti, son comparables a los mostrados por las toxinas de la misma cuando actúan por separado.

Ninguna de las cepas mostró la presencia de proteínas Cyt, ni a nivel del gen, ni en la expresión de la proteína. Los bioensayos usando las mezclas LBIT-980/Cyt mostraron tener un efecto antagónico, mientras que la mezcla de LBIT-1217/Cyt mostraron un efecto aditivo.

Como parte de la caracterización el patrón de plásmidos de la cepa LBIT-980 fue similar a los del serovar tipo *kim* y LBIT-1217 mostró la presencia de cuatro plásmidos dos de más de 16 kb y dos más con tamaños aproximados de 10.5 kb y 14 kb.

Abstract

Bacillus thuringiensis svar. *israelensis* (Bti) and *Lysinibacillus sphaericus* are successfully used to control mosquito populations. However, the possibility of finding novel mosquitocidal activities is still interesting and feasible.

In this work, two strains of *B. thuringiensis* were selected by preliminary bioassays, showing activity against *Aedes aegypti* larvae: LBIT-980 belonging to serovar *kim* isolated from soil; and LBIT-1217, isolated from vermicompost. LBIT-980 showed a collapsed-balloon shaped crystals which contains the Cry59Aa1 protein; while LBIT-1217 strain showed a typical bipyramidal crystal morphology and 76% of identity with the Cry1C protein.

Quantitative bioassays were performed following the standard procedure, using early fourth instar larvae of *A. aegypti*, to determine the toxicity levels. The LC₅₀ of spore-crystal complexes were 6.53 µg/mL and 13.42 µg/mL for LBIT-980 and LBIT-1217 strains, respectively; whereas using pure crystals LC₅₀ of 2.85 µg/ml and 3.99 µg/mL were estimated. Although these toxicity level are far lower than those shown by Bti, they are comparable to those shown by the Bt toxin components tested separately.

None of the both strains showed the presence of Cyt toxins, neither in the gene content nor in the protein content. The bioassays using mixtures of LBIT-980/Cyt showed antagonistic effect and LBIT-1217/Cyt showed an additive effect.

As part of the characterization, plasmid patterns from the LBIT-980 strain are similar to those of serovar *kim* type strain, and LBIT-1217 shows the presence of four plasmids, two larger than 16kb and two more with approximate size of 10.5 kb and 14 kb.

1. INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram positiva y aeróbica cuyo efecto insecticida proviene de inclusiones proteicas parasporales, producidas durante el proceso de esporulación, que están compuestas por proteínas conocidas como proteínas Cry o δ -endotoxinas (Aronson *et al.* 1986, Schnepf *et al.*, 1998). *B. thuringiensis* ha sido utilizada por más de 50 años para el control de insectos plaga de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera e Himenóptera y nemátodos, de forma segura para el ambiente y sin mostrar toxicidad contra mamíferos (Nester *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2007).

Estudios de laboratorio y experiencias de campo demuestran que los bioinsecticidas formulados a base de cristales y esporas de *B. thuringiensis* son seguros para vertebrados, además de tener varias ventajas sobre los insecticidas químicos ya que tienen un rango de hospedero estrecho y altamente específico, son inofensivos hacia insectos benéficos, otros invertebrados y hacia el medio ambiente (Siegel, 2001). Los principales productos están basados en los serovares *kurstaki*, *israelensis*, *aizawai*, *morrisoni*, *alesti*, *galleriae*, *darmstadiensis*, *dendrolimus* y *sotto* (Glare y O'Callaghan, 2000).

Desde el descubrimiento e identificación de *B. thuringiensis*, el interés en esta bacteria ha sido cada vez mayor, en el intento de encontrar nuevas toxinas con actividad biológica diferente. En 1997 Goldberg y Margalit aislaron una cepa que representaba un nuevo serotipo (H-14) y se le denominó *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti).

Bti muestra una elevada actividad insecticida sobre las larvas de dípteros, en particular de mosquitos, y es activa sobre los tres géneros más importantes: *Anopheles*, *Culex* y *Aedes*. Esta subespecie produce 4 toxinas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cry11Aa) y dos toxinas Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba). Además, se ha

informado sobre el efecto sinérgico que existe entre la toxina Cyt en conjunto con las toxinas Cry (Ibarra *et al.*, 2003).

Aunque no existe reporte en condiciones de campo sobre resistencia a Bti, los estudios en el laboratorio han demostrado que se pueden desarrollar altos niveles de resistencia cuando las poblaciones de larvas se seleccionan contra los bacillos recombinantes, que producen una, dos o tres proteínas Cry de esta bacteria mosquitocida; sin embargo, cuando se combinó una de las toxinas Cry con la toxina Cyt la resistencia se suprimía drásticamente (Federici *et al.*, 2005).

El número de cepas conocidas y activas de *B. thuringiensis* con actividad a dípteros está creciendo y la búsqueda de cepas nativas con actividad frente a insectos del orden Díptera podría tener un impacto en el control de mosquitos de todo el mundo, motivo por el cual en el presente trabajo se buscará caracterizar cepas de *B. thuringiensis* de la colección del International Entomopathogenic Bacillus Center (IEBC) del Instituto Pasteur, Francia y cepas nativas de la colección del Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV- Irapuato, México con actividad mosquitocida, determinar las toxinas que contienen y realizar bioensayos mezclando éstas con otras toxinas, por ejemplo con la toxina Cyt1Aa.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

La característica principal de *B. thuringiensis* es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (Figura 1). Estas son proteínas llamadas Cry (del inglés, crystal) constituyen la base del insecticida biológico más utilizado a nivel mundial (Crickmore *et al.*, 1998) y pueden llegar a representar hasta un 30% del peso seco del esporangio (Bulla *et al.*, 1980).

2.2 Breve historia de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis fue aislada por primera vez a partir del gusano de la seda *Bombix mori*, hecho que se le atribuye al japonés Shigetane Ishiwata, quien en 1901 aisló el bacilo de larvas muertas de este lepidóptero al cual denominó "sotto bacillus". Años más tarde, en 1915, Ernst Berliner aisló y describió un organismo similar a partir de larvas enfermas de una población de *Anagasta kuehniella* provenientes de la provincia de Thüringen (Thuringia) Alemania, al cual denominó *B. thuringiensis*, nombre con el cual se le conoció en lo sucesivo (DeLuca, *et al.*, 1981; Whiteley & Schnepf 1986).



Figura 1. Micrografía de *B. thuringiensis* svar. *thuringiensis berliner* 1715 durante el proceso de esporulación. ES: Espora, CP: Cristal Parasporal (Agaïsse y Lereclus, 1995).

De acuerdo con Beegle y Yamamoto (1992), las observaciones de Ishiwata dejaron entrever la posibilidad que la muerte de las larvas fuera causada por alguna toxina y no únicamente por la ingestión del bacilo, debido a que la muerte del insecto ocurría antes de que la bacteria se multiplicara en el interior. Tal hipótesis fue confirmada por Aoki y Chigazaki en 1916 (Lecadet, 1970) quienes reportaron la actividad tóxica de la bacteria en cultivos esporulados pero no en cultivos jóvenes de células vegetativas. Un hecho importante de resaltar fueron las descripciones hechas por Berliner, quien observó la existencia de un segundo cuerpo adicional a la espora en los esporangios desarrollados al cual denominó "restkörper", hecho que fue confirmado por Mattes en 1927 y que Hannay caracterizó como un cristal de forma bipiramidal en 1953 (Lecadet, 1970).

La investigación efectuada por Beegle y Yamamoto (1992) describe detalladamente la historia de *B. thuringiensis* y señala que los primeros intentos para usar la bacteria como agente de control de plagas se registró a finales de los años 20 y principios

de los años 30 para el control de *A. kuehniella* y del barrenador europeo del maíz *Ostrinia nubilalis*. Pero es en 1938 en que se registra la producción comercial de la bacteria, cuando en Francia los laboratorios Libec lo ponen a disposición del público.

La mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* (Bt) caracterizadas en los últimos 40 años muestran actividad tóxica contra especies de insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera o Coleóptera. En la actualidad es la bacteria más utilizada para la formulación de bioinsecticidas alrededor del mundo, disponiéndose de más de 200 productos comerciales para el control de diferentes tipos de insectos plaga. Se han usado masivamente productos formulados a base de *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* en aspersiones aéreas para el control de plagas forestales, de larvas de lepidópteros en hortalizas árboles frutales, plantas ornamentales, cultivos industriales, etc. Productos a base de Bt *israelensis* se han usado para el control de larvas de mosquitos y jejenes de los géneros *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Simulium* y *Mansonia*, transmisores de enfermedades tales como: paludismo, dengue, fiebre amarilla, encefalitis, filariasis y oncocercosis que afectan a la población humana en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Höfte & Whiteley, 1989; Schnepf, *et. al.*, 1998).

Estos hallazgos estimularon la búsqueda de aislados con actividad contra diversos insectos de importancia económica e interesantemente, en años recientes se han identificado cepas con actividades diversas e inusuales. En 1988 se realizó la identificación de cepas con actividad nematocida, en 1990 se identificaron cepas tóxicas a protozoarios y ácaros. Estos descubrimientos han ampliado el potencial uso de *B. thuringiensis* contra un número importante de especies de insectos plaga e insectos no plaga (Feitelson *et al.*, 1992).

2.3 Cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis*

De manera simultánea a la formación de la espora en *B. thuringiensis* tiene lugar la síntesis de uno o varios cristales parasporales, que pueden representar hasta 30% del peso seco del esporangio (Bulla *et al.*, 1980). El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora, y ambos son finalmente liberados tras la lisis celular. Cada cuerpo de inclusión cristalino puede estar constituido por proteínas Cry de una o varias clases (Ibarra and Federici 1986) que se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro (Knowles 1994). La estabilidad de estas uniones condiciona el pH de solubilización del cristal. Particularmente en el caso de los cristales bipiramidales, cuando estos puentes están distorsionados, estos cristales son solubles a pH mayor de 9.5; mientras que si permanecen en su estado más estable necesitan un pH superior a 12 para lograrlo (Lu *et al.*, 1994). Los cristales de *B. thuringiensis* pueden ser degradados por la acción de los microorganismos del suelo (West *et al.*, 1984) y, al igual que sus esporas, también pueden ser inactivados por la acción de la luz ultravioleta (Liu *et al.*, 1993).

2.4 Mecanismo de acción de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describió principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas (δ -endotoxinas) que llevarán a la muerte de la larva. Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la membrana epitelial (Bravo *et al.*, 2004). Posteriormente, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, se inicia una cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006). Por otra parte, en

base a experimentos in vitro, se propone que la unión de los monómeros a la caderina facilita la ruptura proteolítica sobre el extremo N-terminal de la toxina (Gómez *et al.*, 2002). El último rompimiento induce el ensamble de los monómeros y se establece una forma oligomérica pre-poro. Esta estructura incrementa la afinidad por un receptor secundario como pueden ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina. Por último, la unión a ese segundo receptor facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio, lo que provoca un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular (Bravo *et al.*, 2004) (Figura 2).

2.5 Estructura de las proteínas Cry

Las estructuras tridimensionales de las proteínas Cry3A (Li *et al.*, 1991) y Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995) muestran un arreglo estructural muy similar a pesar de mostrar identidad del 36%. Estas similitudes se han mantenido en otras proteínas Cry de las que ha sido resuelta su estructura tridimensional. Dichas proteínas muestran una topología común formada por tres dominios (Figura 3). El dominio I o dominio N-terminal está formado por 7 estructuras α -hélice, donde una hélice central está rodeada por las otras 6. Este dominio participa en la formación del poro en la membrana de las células intestinales del insecto susceptible. El dominio II o dominio central está formado por 3 láminas de estructura en antiparalelo y participa en la interacción con el receptor, por lo que es determinante en la especificidad. El dominio III o dominio C-terminal está formado por dos láminas β -plegadas que forman una estructura tipo sándwich, que parecería ser importante para la estabilidad de la toxina, así como para su especificidad y la modulación de la actividad de canales iónicos en el intestino medio de los insectos susceptibles (Sauka y Benintende 2008).

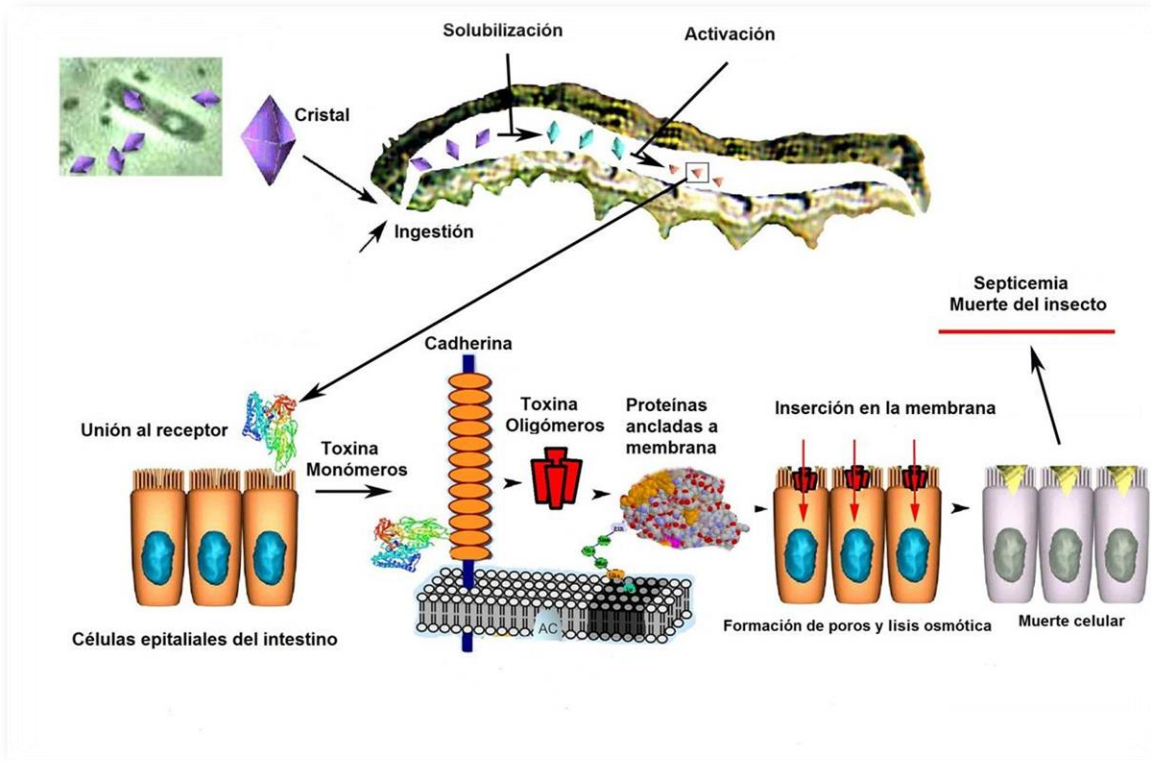


Figura 2. Mecanismo de acción de las de las proteínas entomopatógenas de *Bt*. Bravo et al.,2004.

2.6 Caracterización de variedades de *Bacillus thuringiensis*

Debido al uso de *B. thuringiensis* como bioinsecticida y su transcendencia económica, la caracterización de los diferentes aislados nos permite diferenciarlos y establecer su originalidad por lo que se han desarrollado procedimientos para el estudio y caracterización de aislados. A continuación, se describen las técnicas que han mostrado un importante nivel de confiabilidad para la clasificación de *B. thuringiensis*.

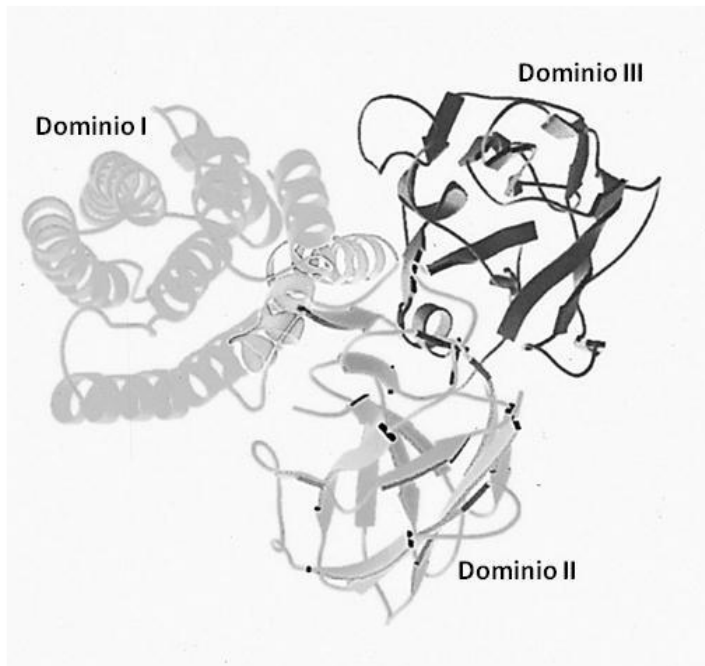


Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína Cry1Aa. Se representan los tres dominios de la proteína (Grochulski *et al.*, 1995).

2.6.1 Caracterización morfológica de los cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis*

La caracterización morfológica se basa en el tamaño y forma que presenta el cristal parasporal. La presencia o ausencia del cristal es el principal criterio para identificar un aislado de Bt y distinguirlo de otras especies relacionadas de *Bacillus*. La morfología del cristal en algunos casos refleja el tipo de especificidad insecticida, aunque la clasificación de variedades en base al tipo de cristal es compleja y poco aplicable, ya que la mayoría de los aislados presentan un cristal bipiramidal o bien semi-esférico a amorfo (Aronson *et. al.*, 1986).

- a) Cristal bipiramidal. Cerca del 80% de las cepas de referencia producen un cristal con morfología típica conocida como bipiramidal, esto lo hace ser el más abundante y hasta 1977 era el único tipo de morfología

conocida. Este tipo de cristal presenta un rango de toxicidad que afecta típicamente a los lepidópteros (Höfte y Whiteley, 1989).

- b) Cristal amorfo. Es un tipo de cristal de forma ovoide a esférico. Este tipo de cristal presentan un espectro de acción tóxica típica hacia insectos dípteros.
- c) Cristal cuadrangular aplanado. Son cristales muy raros y difíciles de encontrar en cepas de *B. thuringiensis*. Los cristales de este tipo presentan toxicidad hacia algunos insectos coleópteros. Lecadet *et. al.*, (1999) analizaron 42 nuevos serovares y sólo en uno de ellos encontraron cristales con esta morfología.
- d) Cristal atípico. Existe una gran cantidad de cepas que presentan un cristal con morfología atípica, es decir, diferente a los cristales ya mencionados. Muchas de las cepas producen este tipo de cristal.

2.6.2 Serotipificación

Esta técnica fue desarrollada por de Barjac y Bonnefoi en 1962 y permite clasificar las cepas de *B. thuringiensis* en diferentes serovarietades o serovares y clasifica las cepas en función de la aglutinación del antígeno flagelar. Para diseñar la estrategia por caracterización serológica, se analizaron 24 cepas de *B. thuringiensis* en base a características morfológicas y bioquímicas. Inicialmente se seleccionaron cepas con características morfológicas comunes: movilidad, morfología flagelar, forma de endospora y la inclusión proteica o cristal. Para agruparlas se realizó un análisis bioquímico en base a la formación de lecitinasa, fermentación de sacarosa, poder proteolítico y poder de hidrólisis en diversos medios, y aspecto sobre el crecimiento. Después de las observaciones bioquímicas, agruparon las 24 cepas en 6 grupos. Antes de la caracterización bioquímica, inocularon conejos con una suspensión flagelar de cada cepa para obtener anticuerpos específicos para cada tipo de flagelo o antígeno flagelar. Al analizar las reacciones de las cepas ante los diferentes anticuerpos corroboraron la clasificación realizada bioquímicamente. En

base a la clasificación bioquímica se designaron los anticuerpos para cada grupo (H1, H2, H3, etc.) y dividieron los anticuerpos Hn en biotipos señalados por letras. Para serotipificar un nuevo aislado, se deben utilizar todos los antisueros o antígenos H de referencia y analizar su aglutinación en ellos. Cuando la cepa no reacciona contra ninguno de los antisueros, se considera un nuevo serotipo, de lo contrario se prueba con otros factores antigénicos para determinar la serovariedad. La serotipificación ha sido un método eficiente en la caracterización de cepas, ya que permite clasificar cepas de *B. thuringiensis* acristalíferas que por otro tipo de caracterización hubieran sido clasificadas erróneamente (Lecadet *et al.*, 1999).

2.6.3 Patrón de Plásmidos

Una característica común de muchas de las cepas de *B. thuringiensis* es la presencia de un arreglo complejo de DNA extracromosómico (plásmidos). El número y tamaño de estos varía en diferentes cepas, oscilando desde un único plásmido hasta 17 y de 1.4 MDa a 180 MDa (Baum y González, 1992; González y Carlton, 1980).

Reyes-Ramírez e Ibarra en 2008 realizaron una clasificación de cepas de *B. thuringiensis*. Ellos evaluaron el patrón de plásmidos de 130 cepas de *B. thuringiensis* provenientes de 83 serotipos. Los resultados indican que todas las cepas contienen de 1 a 13 plásmidos y cada una es caracterizada por un patrón de plásmidos. Observaron que, dentro de un mismo serotipo, las cepas pueden tener variaciones de un mismo patrón de plásmidos que denominaron “ancestral”. El patrón de plásmidos es un método que permite diferenciar cepas de *B. thuringiensis* y es compatible con la serotipificación. Además, es aplicable para discriminar cepas dentro de un serotipo y no para discriminar serovariedades ya que presentan patrones únicos y diferentes.

2.6.4 Secuenciación de los genes de la flagelina

En 2008 Xu y Côté reportaron una estrategia que permite diferenciar cepas de *B. thuringiensis* de igual forma que la serotipificación. Adicionalmente, este método elimina la limitante que presentan las cepas autoaglutinantes. Este método se basa en la comparación de las secuencias de las proteínas del flagelo. En este reporte, se utilizaron las 5 secuencias reportadas de los genes del flagelo de *B. thuringiensis*, *hag*, *fliC*, *flaA*, *flaB* y *flaC*. Se compararon las secuencias de aminoácidos de la flagelina de 41 cepas pertenecientes a 24 serovares provenientes de 11 serotipos H diferentes. De los 69 serotipos H conocidos, 10 contienen 3 o más factores antigénicos y se dividen en 23 serovares. La comparación de las secuencias del flagelo de los serotipos H5, H11 y H20 muestra que son altamente conservadas, mientras las de los serotipos H4, H10, H18, H24 y H28 son altamente divergentes a pesar de que todas tienen tres factores antigénicos. Los serotipos H3 y H8 tienen 5 y 4 factores antigénicos, respectivamente. Todas las cepas de *B. thuringiensis* tienen al menos dos genes flagelares (*hag* y *fliC*) de los cuales el gen *hag* provoca la reacción inmunológica utilizada en la serotipificación.

2.6.5 Secuenciación de los genes codificantes de las δ -endotoxinas.

El estudio de los genes *cry* o *cyt* se realiza comúnmente por amplificación a través de PCR, identificando los diferentes genes por medio de iniciadores específicos para determinar la presencia o ausencia de un gen en especial o la obtención de un amplicón que posteriormente se secuenciará (Porcar y Juárez-Pérez, 2003). Noguera e Ibarra en 2010 realizaron alineamientos de genes *cry* pertenecientes a todas las familias descritas de *B. thuringiensis* y diseñaron iniciadores universales basándose en 5 bloques parcialmente conservados. Propusieron el uso de tres pares de iniciadores que teóricamente amplifican el 100% de los genes *cry* de tres dominios conocidos. Analizaron 27 cepas atípicas y los resultados revelaron que las amplificaciones fueron específicas y los productos de amplificación correspondieron

a genes *cry* en todos los casos. Identificaron 9 secuencias con menos del 78% de identidad en 14 cepas, y de ellas se reportaron 7 nuevos genes *cry* y secuenciaron completamente 3 genes *cry*. En este estudio los autores concluyen que este método es eficiente para identificar genes *cry* conocidos y desconocidos, además de que resulta ser un método de caracterización fácil y rápida.

2.7 Usos de *Bacillus thuringiensis*.

Durante los últimos 50 años, el combate de insectos plaga en la agricultura se ha hecho principalmente por medio de insecticidas químicos. Esta práctica ha sido muy útil en la protección de las cosechas a través de los años, pero también ha ocasionado daños a la salud y a la vida del hombre, al medio ambiente, a organismos benéficos para la agricultura y ha provocado que muchos insectos se hayan convertido en plagas mucho más difíciles de controlar. Esta situación ha provocado la necesidad de desarrollar medidas de control más robustas, y el control biológico ha mostrado ser la herramienta más eficiente (Casida y Quistad, 1997).

El uso de microorganismo ha mostrado ser la mejor alternativa para el control de insectos plaga ya que evitan el uso de insecticidas químicos y presentan una elevada toxicidad específica. De los beneficios que brinda el uso de los bioinsecticidas se incluye la disminución de la contaminación y el daño al medio ambiente, además que continúa estimulando la búsqueda de nuevos agentes de control biológico. Entre los agentes de control biológico más utilizados hoy en día se encuentra la bacteria *B. thuringiensis* ya que representa cerca del 95% de los organismos usados para el control de plagas agrícolas en diversos cultivos (Lambert *et al.*, 1992). Se han identificado cepas de *B. thuringiensis* que producen diferentes toxinas. La importancia de esta clase de proteínas insecticidas ha hecho que la expectativa sea de crecimiento en un futuro cercano, debido al éxito de los cultivos modificados genéticamente y plantas de segunda generación que expresan múltiples proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* (Whalon y Wingerd, 2003).

Se han identificado un número importante de cepas con actividad contra lepidópteros, coleópteros, dípteros y otros órdenes de insectos. Sin embargo, la necesidad de controlar insectos que se han convertido en plagas importantes debido a los daños económicos que han causado ha llevado a la búsqueda y aislamiento de nuevas cepas que sean más tóxicas o que presenten nuevos rangos de acción (Swamy *et al.*, 2012).

2.8 *Bacillus thuringiensis israelensis* como agente de control biológico.

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) son uno de los principales problemas de salud pública, y su prevalencia se ha incrementado dramáticamente en todo el mundo. Los mosquitos constituyen un grupo de insectos de gran importancia desde el punto de vista médico epidemiológico, debido a que muchas de sus especies, además de provocar molestias al hombre y a los animales, son vectores de agentes causales de enfermedades como paludismo (malaria) y dengue (Samanidou-Voyadjoglou *et al.*, 2007).

En la actualidad, los mejores métodos de control de estas enfermedades se basan en el control del vector, que se lleva a cabo principalmente mediante el uso de insecticidas químicos. Además, los mosquitos han desarrollado resistencia a los principales grupos de estos. Un ejemplo es el DDT, que logró controlar las poblaciones de mosquitos, pero sólo por 8 años, ya que la resistencia del mosquito eventualmente apareció (Ibarra *et al.*, 2003)

El uso de bacterias entomopatógenas como biolarvicidas es una alternativa viable para el control de mosquitos. Desde el descubrimiento e identificación de *B. thuringiensis*, el interés en esta bacteria ha sido cada vez mayor, en el intento de encontrar nuevas toxinas con actividad biológica diferente (Khyami-Horani *et al.*, 2003). Hasta 1976 se conocía que *B. thuringiensis* sólo era tóxico contra larvas de

lepidópteros, sin embargo, Goldberg y Margalit (1977), aislaron una cepa en el desierto del Negev (Israel). Este aislado representaba un nuevo serotipo (H-14) y se le denominó *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) (de Barjac, 1978). Bti muestra una elevada actividad insecticida sobre larvas de dípteros, en particular de mosquitos (Culicidae) y jejenes (Simuliidae); entre los mosquitos, es activo sobre los tres géneros más importantes: *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, en orden de susceptibilidad (Ibarra et al., 2003).

El componente principal insecticida de *B. thuringiensis israelensis* es un cuerpo parasporal de semiesférico a amorfo producido durante la esporulación y compuesto por cuatro proteínas principales Cyt1Aa, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa. Este cuerpo parasporal es uno de los más conocidos insecticidas, con una concentración letal media (LC₅₀) de aproximadamente 10 ng/mL contra larvas de diversas especies de mosquitos. Numerosos estudios han demostrado que la alta toxicidad y amplio espectro de actividad de *B. thuringiensis israelensis* se deben principalmente a las interacciones sinérgicas entre la toxina Cyt1Aa y las proteínas Cry, así como interacciones sinérgicas que se producen entre las proteínas Cry (Federici et al., 1990).

Los productos de Bt basados en esta serovariedad han logrado tener gran éxito y son el principal insecticida microbiano utilizado en el control de vectores de enfermedades, especialmente en países en desarrollo. Aunque el espectro insecticida de Bti abarca principalmente especies de dípteros, algunos insectos de otros órdenes, como lepidópteros y coleópteros, también han mostrado cierto grado de susceptibilidad. El éxito experimentado con la cepa Bti estimuló en todo el mundo el desarrollo de programas de búsqueda de nuevas bacterias y cepas de *B. thuringiensis* con actividad mosquitocida. Hasta la fecha, se han descubierto numerosos aislados, aunque su efectividad nunca ha superado la de Bti (Federici et al., 2005).

2.9 Vectores y enfermedades que transmiten

Los vectores son organismos vivos que pueden transmitir enfermedades infecciosas entre personas, o de animales a personas. Muchos de esos vectores son insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos junto con la sangre de un portador infectado (persona o animal), y posteriormente los inoculan a un nuevo portador al ingerir su sangre. Los mosquitos son los vectores de enfermedades mejor conocidos. Ya que son los que mayor número de enfermedades transmiten. De las especies existentes se encuentra *Anopheles*, transmisor del paludismo, *Culex*, que transmite enfermedades tales como encefalitis japonesa, filariasis linfática, fiebre del Nilo occidental; y *Aedes* el que mayor cantidad de enfermedades transmite, como la fiebre amarilla, la fiebre del Valle del Rift, Chikungunya, Zika y dengue (OMS, 2016). Esta última es la enfermedad viral más importante transmitida por *Aedes aegypti* y se desarrolla principalmente en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Guzmán y Kouri, 2002).

2.9.1 El dengue y su situación en el mundo

Existe una controversia sobre el origen del dengue y su vector, ya que datos históricos reseñan que fue conocida en 1585 con la aparición de casos en África, mientras que otros científicos atribuyen su origen en el continente americano. Sin embargo, es un hecho que las primeras epidemias de dengue se extendieron por el Caribe, Centro América y Norte América (Rigau-Pérez, 1998). En las últimas décadas, la incidencia de dengue ha aumentado enormemente en el mundo, ya que más del 50% de la población mundial, aproximadamente 3,500 millones de individuos, están en riesgo de contraer la enfermedad. Previo a la década de los años setenta, sólo 9 países habían sufrido epidemias de dengue grave; actualmente

la enfermedad es endémica en más de 112 países de las regiones de África, América, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (figura 4). La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que cada año se producen entre 50 millones y 100 millones de infecciones por el virus del dengue clásico en el mundo. Además de que el número de casos aumenta a medida que la enfermedad se propaga a nuevas zonas (Lemus *et al.*, 2002).

2.9.2 El dengue: Situación Nacional

Prácticamente eliminado en los años sesenta a través de una extensa campaña contra la fiebre amarilla, el dengue se hizo de nuevo presente a finales de la siguiente década en el continente americano, incluyendo México. En la actualidad, el dengue se considera la enfermedad re-emergente más importante y sus formas hemorrágicas son cada vez de mayor relevancia, especialmente debido al aumento progresivo en el número de defunciones en toda la región. Por ejemplo, en 2008, en regiones de América, Asia Sudoriental y Pacífico Occidental se registraron en conjunto más de 1.2 millones de casos, y en 2010, más de 2.2 millones, según datos oficiales presentados por los países miembros a la OMS. Posteriormente, en 2010, se notificaron 1.6 millones de casos solamente en América; 49 mil de ellos fueron graves. De acuerdo con el actual Programa de Acción Específico de Dengue, la enfermedad se encuentra presente en México con variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes, principalmente en los estados de la región sur-sureste, Pacífico y Golfo de México. En México al cierre del 2015, se registró un descenso en el número de casos totales confirmados por dengue (-16.7%) con respecto al 2014, lo que sin duda refleja el resultado de los esfuerzos de prevención (figura 5). Del total nacional, la enfermedad se concentró en los estados de Veracruz, Sonora, Jalisco, Guerrero y Michoacán (50%) y se reportaron 42 defunciones, 44.7% menos que en 2014. (SSA, 2016)



Figura 4. Panorama de Dengue en el mundo, 2010. Fuente: Center for Disease Control and Prevention CDC, 2010

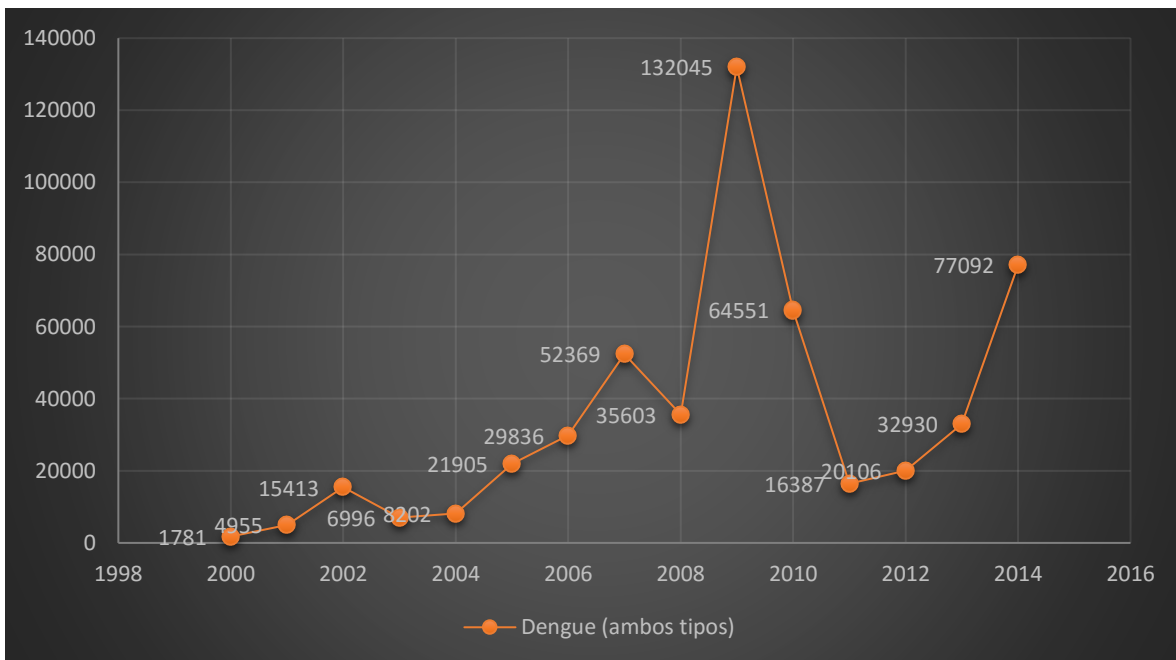


Figura 5. Panorama de casos de dengue en México por año, de 2000-2014. (Basado en información del CENAVECE/ Anuario de Morbilidad 2000-2013/ Panorama Epidemiológico de Dengue, Cierre 2015)

3. JUSTIFICACIÓN

El problema del control de vectores de enfermedades en el mundo se agudiza, reflejado en los niveles epidemiológicos que han alcanzado en los últimos años. De las enfermedades más recurrentes en la actualidad, destacan la fiebre amarilla, el dengue, Chikungunya y Zika. Todas ellas transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti*.

Las estrategias de control que se han empleado podrían diversificarse, pero prevalece la aplicación de insecticidas, trayendo como consecuencia aparición de genes de resistencia en las poblaciones de insectos, pero existen algunas estrategias novedosas, como la liberación de mosquitos transgénicos (machos estériles)

Por ello es de vital importancia incrementar el arsenal de medidas de control. De ahí el interés e importancia de buscar, estudiar y medir la potencialidad de nuevas toxinas de *B. thuringiensis* que sean amigables al medio ambiente y que no provoquen daños secundarios.

4. HIPÓTESIS

Las proteínas Cry de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 son tóxicas contra larvas de *Aedes aegypti* y al interactuar con la toxina Cyt1Aa, establecen un sinergismo, aumentando de esta manera su nivel de toxicidad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Caracterizar las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 de *B. thuringiensis* y determinar el nivel de toxicidad individual y colectivo que presentan con la toxina Cyt1Aa, comparándolo con las toxinas mosquitocidas conocidas.

5.2 Objetivos Específicos

1. Realizar bioensayos del complejo espora cristal y cristal puro de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217.
2. Realizar bioensayos con Bti y sus toxinas Cry11Aa, Cry4Ba, Cry4Aa por separado para determinar y comparar la CL₅₀.
3. Realizar bioensayos con la toxina Cyt1Aa, en mezclas con las cepas LBIT-980 y LBIT-1217.
4. Caracterizar molecularmente las cepas LBIT-980 y LBIT-1217.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas empleadas

Para el presente estudio se utilizaron cepas de *B. thuringiensis* de la colección del International Entomopathogenic Bacillus Center (IEBC) del Instituto Pasteur, Francia y cepas nativas de la colección del Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV- Irapuato, México. Se utilizaron las cepas de referencia internacional *B. thuringiensis* var. *kurstaki* aislados HD73 y HD-1 y *B. thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) de la colección del laboratorio de Bioinsecticidas para hacer una comparación válida entre los diferentes métodos. Las cepas nativas utilizadas fueron aisladas de diferentes fuentes, la primera de ellas, LBIT-980, aislada del suelo y perteneciente al svar *kim*, y la segunda, LBIT-1217, aislada de lombricomposta. Todas las cepas se encuentran liofilizadas y almacenadas a -20°C. Para su activación fueron sembradas en agar para métodos estándar e incubadas a 28°C durante 24 h.

6.2 Mantenimiento de *Aedes aegypti*.

El mantenimiento de *Aedes aegypti* se llevó a cabo bajo las indicaciones del Insectario de CINVESTAV- Irapuato, México, 28°C, con un fotoperiodo de 12:12 h (luz: oscuridad) y una humedad relativa de 80%, se utilizaron larvas de cuarto instar a los cuales se les suministro sacarosa 10% como parte de su dieta.

6.3 Preparación del complejo Espora-Cristal de *B. thuringiensis*

Para realizar los bioensayos correspondientes se utilizó polvo liofilizado del complejo espora-cristal, procediéndose a la obtención de éstos de la siguiente manera: las cepas fueron inoculadas en 100 mL de medio con medio de leche peptonizada (López-Meza *et al.*, 1995) contenida en matraces de 500 mL. Se incubaron a 30°C con agitación constante (280 rpm) durante un período de 3 a 4 días hasta que se observó completa autólisis. Posteriormente se realizó la colecta del complejo espora-cristal mediante centrifugación, esta se realizó a una velocidad de 13,000 rpm durante 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 15 mL de agua estéril fría y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Este procedimiento se realizó por tres veces consecutivas. Finalmente, el precipitado fue congelado y secado en una liofilizadora (Labconco LYPH Lock 4.5) para su posterior uso.

6.4 Purificación de cristales paraesporales

La obtención de cristales parasporales puros se realizó mediante el uso de gradientes continuos de bromuro de sodio. Para ello, las soluciones de bromuro de sodio fueron preparadas en Tween 80 al 0.01%. Se tomaron alrededor de 10 mg del complejo espora-cristal y se resuspendió en bromuro de sodio (15%) y fueron colocados sobre 32 mL del gradiente continuo de bromuro de sodio (20% a 40%, peso/volumen). Los gradientes fueron centrifugados durante 1 h a 25,000 rpm y 4°C, para ello se utilizó la ultracentrífuga Beckman XL-90 con el rotor de columpio SW-28. Las bandas correspondientes a los cristales puros se recolectaron y lavaron con agua destilada por 3 veces, entre cada lavado se resuspendió la pastilla y se centrifugó por 15 min a 13000 rpm. Las pastillas fueron congeladas y posteriormente liofilizadas. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.5 Bioensayos en *Aedes aegypti*

6.5.1 Bioensayos Cualitativos

Para realizar los bioensayos cualitativos se utilizaron larvas de *Aedes aegypti* de cuarto instar temprano y se manejaron 20 larvas/ 100 ml de agua potable como unidad de muestra y fueron colocadas en vasos desechables con capacidad de 100 mL. Posteriormente se agregó complejo espora-cristal de las cepas de estudio de *B. thuringiensis* liofilizado y se mantuvieron bajo condiciones de insectario, hasta proceder la lectura de los bioensayos.

6.5.2 Bioensayos Cuantitativos

El procedimiento para los bioensayos fue basado en un protocolo ya estandarizado para Bti, llamado el estándar americano de McLaughlin y colaboradores (1984).

Los procedimientos y especificaciones del bioensayo son:

1. Las larvas de *Aedes aegypti* utilizadas en el bioensayo fueron de cuarto instar temprano y se manejaron 20 larvas/ 100 mL de agua potable como unidad de muestra, siendo colocadas en vasos desechables con capacidad de 100 mL.
2. Se utilizaron seis dosis por bioensayo con diluciones en progresión geométrica dada por un factor de dilución de 0.6.
3. La preparación de las dosis se realizó por diluciones a partir de una suspensión patrón (peso conocido de complejo espora-cristal o cristal puro, diluido en 1 mL de Tween 80 al 0.02%).

4. El agua utilizada para las diluciones debe ser destilada o desionizada, y es recomendable agitar bien la suspensión cada vez que se realice una nueva dilución.

5. Durante la exposición de las larvas al biocida, el bioensayo se mantuvo bajo las condiciones de 24°C y 80% de humedad relativa.

6. Se utilizaron 3 unidades de muestra sin complejo espora-cristal o sin cristal puro como testigos negativos.

7. El tiempo de exposición al tratamiento fue de 24 h y la lectura de la mortalidad se obtuvo por conteo de las larvas sobrevivientes al final de dicho periodo de tiempo.

Los datos obtenidos en cada bioensayo fueron procesados en un sistema computacional de análisis PROBIT y, para considerarlos estadísticamente válidos debieron cumplir con los siguientes requisitos (Ibarra y Federici, 1987):

- La mortalidad del testigo negativo no debe exceder del 10%
- Debe haber al menos dos dosis arriba y dos debajo de la CL_{50} estimada
- Cuatro dosis o más deben presentar mortalidad entre 10% y 90%
- El valor de la pendiente debe estar entre 1.5 y 6
- El cociente del límite fiducial máximo sobre el mínimo debe ser menor o igual a 2
- Deben hacerse al menos tres repeticiones válidas
- El coeficiente de variación no debe ser mayor a 20%

6.6 Microscopía de las cepas seleccionadas

La morfología de los cristales de las cepas seleccionadas para este estudio se determinó por microscopía óptica de contraste de fases y microscopía electrónica

de barrido. Para las observaciones se utilizaron muestras que estaban ya en completa autólisis de cada una de las cepas seleccionadas.

Para la microscopía óptica se tomó media asada del cultivo y se disolvió en 100 μ L de agua, posteriormente se tomaron 3 μ L y se esparcieron en un cubre objeto, se dejaron secar al aire libre, se agregó una gota de glicerol concentrado y se tapó con un cubre objeto. Las muestras se observaron en un microscopio óptico de contraste de fases a 100X (Axioplan, Zeiss).

La morfología de los cristales también fue examinada por microscopía electrónica de barrido a través del microscopio VPSEM (EVO LS40, Zeiss, Alemania), acoplado a una platina peltier con rango de temperatura de -25°C a 50°C a 50 Pa con temperatura ambiente de 17°C (Deßen EVO® XVP® Coolstage, Reino Unido), la muestra fue fijada a la platina mediante una cinta conductiva de cobre. En todos los experimentos se mantuvieron las siguientes condiciones de operación: alta tensión (EHT) 30 kV, Fil I Target 2.508 A, distancia de trabajo 22 mm y Spot Size de 600 ± 5 . Las micrografías fueron capturadas a 1.0KX de magnificación y con una resolución de 1024x768 píxeles en escala de grises. En este formato, se asignó una escala de grises con 0 para el negro y 255 para el blanco.

6.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

El análisis de las proteínas de las cepas seleccionadas se realizó mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida, básicamente de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970). La concentración de acrilamida que se utilizó para los geles de concentración fue de 4% y en los geles de separación de un 10%.

A partir de las muestras del complejo espora-cristal y cristales puros de las cepas LBIT-980, LBIT-1217, Bti, HD-1 y HD73 se prepararon de la siguiente manera. Se prepararon soluciones de 50 μ L que contenían una cantidad apropiada de cada muestra a analizar. Se adicionaron 50 μ L de amortiguador de carga 2x (Tris-HCL 25 mM pH 6.8; β -mercaptoetanol 1.28 M; azul de bromofenol 2.89 mM; SDS 0.15 M y glicerol 2.17 M). Posteriormente las muestras fueron hervidas durante 7 min y se centrifugaron 30 s a 13,000 rpm. Se utilizaron 20 μ L de cada cepa para ser cargados en el gel.

Para la formación de los geles se utilizó acrilamida y bis-acrilamida para la polimerización y como agente entrecruzador, respectivamente. El TEMED y el persulfato de amonio se emplearon como catalizadores, el primero como iniciador de la polimerización y el segundo como propagador de la misma. El detergente SDS como agente desnaturizante de proteínas y el amortiguador Tris-HCL para permitir un ambiente óptimo en el desplazamiento de las proteínas desnaturizadas.

Para la preparación de los geles concentrador (4%) y separador (10%) se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos.

Gel concentrador (4%)

- Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (40%)	0.4 mL
- Tris-HCl 1 M pH 8.8	0.5 mL
- SDS 10%	30 μ L
- Persulfato de amonio 10%	50 μ L
- TEMED	5 μ L
- Agua destilada	3.725mL

Gel separador (10%)

- Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (40%)	1.5 mL
- Tris-HCl 1 M pH 8.8	2.24 mL
- SDS 10%	50 μ L
- Persulfato de amonio 10%	50 μ L
- TEMED	5 μ L
- Agua destilada	2.18 mL

Electroforesis: La electroforesis de las proteínas se realizó durante una 1 h a 60 V, seguido de 2.5 h a 100 V. Se utilizó como amortiguador de corrida Tris-Glicina 1X (Tris 2.5 mM; Glicina 19.2 mM; SDS 1%). Esta técnica se llevó a cabo en la cámara de electroforesis ENDURO, de Electrophoresis Systems.

Tinción de gel: Para la visualización de las proteínas se utilizó Azul de Coomassie. Durante la tinción del gel se colocó en una solución que contenía 0.25 g de azul brillante de Coomassie, 90 mL de una mezcla de metanol-agua (1:1) y 10 mL de ácido acético glacial por un tiempo de 10 minutos. Por último, el gel se pasó a una solución de desteñido que contenía metanol 10%, ácido acético glacial 10% y agua destilada, por un tiempo de 5 h a temperatura ambiente y movimiento constante. Los geles fueron documentados en el Gel Doc 2000 TM Gel Documentation System (BioRad).

6.8 Extracción de DNA plasmidico de *B. thuringiensis*

Para la extracción del DNA plasmídico se utilizaron 50 mL de un cultivo bacteriano fresco (12h) en medio Spizizen con una D.O.₆₀₀ de 0.9. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 5

mL de agua desionizada, se resuspendió suavemente en 20 mL de buffer TES (30 mM de Tris base; 5 mM de EDTA; 50 mM de NaCl; pH 8.0) frío y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 15 min. Las células obtenidas se resuspendieron suavemente en TES-sacarosa 20%, se agregó lisozima (2 mg/mL) y 2 μ L/mL de RNAsa, se incubó durante 2 h a 37°C o hasta observar la formación de esferoplastos (células sin pared celular) . Se adicionaron 3 mL de SDS 8% en TES y se incubó a 68°C durante 10 min. Posteriormente se adicionó 1.5 mL de acetato de sodio 3M pH 4.8, se incubó 30 min a -20°C y se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó toda la noche a -20°C. El DNA se recuperó por centrifugación a 13,000 rpm por 20 min a 4°C. Finalmente la pastilla se resuspendió en 100 μ L de TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA) pH 8.0. Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 0.6%.

6.9 Análisis del DNA plasmídico de *B. thuringiensis*

Para visualizar los patrones de plásmidos de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas se utilizaron 10 μ L de suspensión de DNA, los cuales fueron visualizados en geles de agarosa (11 cm x 14 cm) al 0.6%, utilizando buffer TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM) 1%. Los geles fueron sometidos a 2 V/cm durante 18 h. Posteriormente fueron teñidos 15 min en bromuro de etidio a una concentración de 0.4 μ L/mL y desteñidos en agua desionizada durante 1 h. Se utilizó el marcador de peso molecular Supercoiled (Invitrogen) y los geles fueron documentados en el Gel Doc 2000 TM Gel Documentation System (BioRad).

6.10 Extracción de DNA total de *B. thuringiensis*

La extracción de DNA cromosómico se realizó utilizando el método reportado por Rosso y Delécluse (1997) modificado. Colonias aisladas de las cepas en estudio fueron inoculadas en 4 ml de medio LB contenidos en tubos Falcon de 15 mL y se incubaron a 30°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 1.0. El cultivo se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y la pastilla se resuspendió en 500 µl de buffer J (Tris-HCl 1M; EDTA 0.1 M; NaCl 0.15 M; pH 8.0) y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le añadieron 300 µL de buffer J, se adicionaron 10 µl de lisozima (40 mg/ml) y se incubó por 30 min a 37°C. Posteriormente se adicionaron 12 µL de SDS al 10% y se incubó a 70°C por 10 min, transcurrido el tiempo se dejó que la temperatura llegara a 50°C. Se adicionaron 10 µl de RNAsa (10mg/mL) y se incubó 15 min a 37°C y posteriormente se adicionaron 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL) seguido de incubación bajo las condiciones anteriores, se adicionaron 35 µL de NaCl 5M, se incubó en hielo por 15 min y se centrifugó 11 min a 13,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, se agregó un volumen igual de isopropanol y se incubó 20 min a -70°C. Se recuperó el DNA por centrifugación a 13,000 rpm por 15 min. Se lavó la pastilla dos veces con 500 µL de etanol al 70% y posteriormente se secó a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 30 µL de agua desionizada estéril. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1% y almacenadas a -20°C.

6.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

6.11.1 Genes de la flagelina

Para amplificar los genes de la flagelina se utilizó DNA total de *B. thuringiensis* como templado, de las muestras seleccionadas. Los oligonucleótidos utilizados (tabla 1) fueron diseñados para la amplificación de la subunidad *hag* de las proteínas de

flagelo de *B. thuringiensis*. Se realizó una mezcla de DNA cromosómico de las cepas de *B. thuringiensis*, 100 ng del oligonucleótido directo y 100 ng del oligonucleótido reverso, 2.5 U.I. de Taq Polimerasa, 5mM de MgCl₂, 100 μM de mezcla de dNTP's. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 μL. El proceso se realizó empleando el termociclador Applied Biosystems 2720 utilizando las condiciones descritas en la tabla 1.

6.11.2 Genes codificantes de proteínas Cry y Cyt

Para amplificar los genes codificantes de las proteínas Cry y Cyt se utilizó DNA total de *B. thuringiensis* como templado. Para la amplificación e identificación de genes *cry* se utilizó el sistema de iniciadores reportado por Noguera e Ibarra (2010); para identificar genes *cyt*, se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar genes de la familia *cyt* (tabla 1). Se realizó una mezcla de DNA cromosómico de las cepas de *B. thuringiensis*, 100 ng de los oligonucleótidos directo y reverso, 5mM de MgCl₂, 2.5 U.I de Taq polimerasa Platinum, 0.4 mM de dNTP's y un amortiguador de reacción. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 μL. El proceso se llevó a cabo en un termociclador de gradiente AB Applied Biosystems Modelo Veriti.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación por PCR.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Orientación	Región a amplificar
Bloque 1	TATGCWCAAGCWGCCAATYTWCATYT	Directo	Genes <i>cry</i>
Bloque 5	GGRATAAATTCAATTYKRTCWA	Reverso	
Gral-cytF	AACCCCTCAATCAACAGCAAGG	Directo	Genes <i>cyt</i>
Gral-cytR	GGTACACAATACATAACGCCACC	Reverso	
BThag1F	AGTACATGCGCCAAAACCAAG	Directo	Gen de la flagelina sitio <i>hag</i>
BThag1R	GTTTGCTTGAGAAAGCATGCT	Reverso	

Tabla 2. Condiciones utilizadas para la amplificación por PCR.

Reacción	Desnaturalización inicial	Condiciones de amplificación (30 ciclos)			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
cyt1	94°C / 5 min	94°C / 1min	58°C / 1 min	72°C 45 seg	72°C / 7 min
Flagelina	95°C / 5 min	95°C / 45 seg	58°C / 45 seg	72°C / 1.5 min	
Bloques 1-5	94°C / 5 min	94°C / 50 seg.	45°C / 1.5 min	72°C / 1.5 min	72°C / 10 min

6.12 Análisis del DNA Total de *B. thuringiensis* y amplicones

Para visualizar el DNA de *B. thuringiensis* de las cepas seleccionadas, el sitio *hag* del gen de la flagelina y los amplicones de los genes *cry* y *cyt* se utilizó 5 µl de suspensión de DNA, y éste fue visualizado en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM) 1%. Los geles fueron sometidos a 90 V/cm durante 1 h y teñidos con GelRed, se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder y fueron documentados en el Gel Doc 2000 TM Gel Documentation System (BioRad).

6.13 Aislamiento de DNA de geles de agarosa

Para purificar las bandas de DNA a partir de los geles de agarosa se empleó el kit comercial Zymo Clean Gel DNA Recovery Kit de Zymo Research siguiéndose las instrucciones del proveedor.

6.14. Secuenciación

Los amplicones fueron secuenciados mediante pirosecuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron por medio de NCBI-Blastn, NCBI-Blastp y NCBI-Blastx (Altschul et al., 1990, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con las opciones predeterminadas.

7. RESULTADOS

7.1 Actividad mosquitocida de *B. thuringiensis*

7.1.1 Selección de las cepas de mosquitocidas de *B. thuringiensis*

La selección de cepas mosquitocida se realizó mediante la aplicación de ensayos burdos o cualitativos. Antes de realizar los bioensayos, se realizó un primer escrutinio de 27 cepas atípicas pertenecientes al Laboratorio de Bioinsecticidas con las que se llevó a cabo bioensayos con diferentes clases de insectos, del cual la cepa LBIT-980 de *B. thuringiensis* presentó actividad mosquitocida (Gutiérrez, 2008). En un segundo escrutinio, se seleccionaron 96 cepas nativas, se realizaron bioensayos cualitativos, se identificaron las que presentaron actividad mosquitocida y se seleccionó la cepa LBIT-1217 de *B. thuringiensis* que presentó características morfológicas similares a las cepas que son tóxicas hacia la clase lepidóptera; sin embargo, esta presentó actividad mosquitocida. Una vez seleccionadas las cepas de estudio se corroboró que las cepas efectivamente presentaran actividad mosquitocida con tres repeticiones de bioensayo cada uno con tres replicas y su respectivo control.

Al realizar los bioensayos preliminares con las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 se observó que hubo mortalidad y posteriormente se procedió a realizar los bioensayos cuantitativos para determinar la concentración letal media (CL_{50}) de las cepas de estudio.

7.1.2 Determinación de las concentraciones letales medias (CL₅₀).

Para determinar la concentración letal media o CL₅₀ se realizaron bioensayos cuantitativos, este tipo de bioensayos permitió determinar el nivel de toxicidad de las cepas de estudio contra *Aedes aegypti*. Los bioensayos se realizaron a partir de muestras liofilizadas de complejo espora-cristal y de cristales puros, lo cual permitió obtener concentraciones conocidas de las cepas.

Los primeros bioensayos se realizaron con complejo espora-cristal de las cepas seleccionadas, como se indicó en la metodología. En la tabla 3 se puede observar los resultados de la CL₅₀ cuando se aplicó el complejo espora-cristal para las cepas LBIT-980 (Tabla 3a) y LBIT-1217 (Tabla 3b). Para la obtención de los cristales puros, se utilizaron gradientes continuos de bromuro de sodio. El gradiente de la cepa LBIT-980 (Figura 6a) mostró sólo una banda de cristales parasporales altamente puros, de igual manera la cepa LBIT-1217 (Figura 6b) presentó una banda de cristales parasporales, y en ambos mantuvieron su actividad mosquitocida. Se procedió a realizar los bioensayos cuantitativos con los cristales parasporales puros de ambas cepas. Para determinar las concentraciones letales medias se realizó un análisis PROBIT. En la Tabla 3a/3b se muestran las concentraciones letales medias del complejo espora-cristal para las cepas estudiadas, 6.53 µg/mL y 13.42 µg/mL de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217, respectivamente; entretanto las concentraciones correspondientes de los cristales parasporales puros se estimó en 2.85 µg/mL y 3.99 µg/mL de las cepas LBIT-980 (Tabla 3c) y LBIT-1217 (Tabla 3d).

Para comparar la efectividad de los cristales parasporales puros de las cepas estudiadas con respecto a las ya reportadas se realizaron bioensayos cuantitativos con los cristales parasporales puros de *Bti* y algunas de sus toxinas por separado, que contiene su cristal parasporal. Previo a los bioensayos se purificaron los cristales de las cepas de *B. thuringiensis* que contienen las toxinas Cry4B, Cry11A, Cyt1A y la cepa de Bti. Se utilizó bromuro de sodio para purificar los cristales

parasporales de las cepas. El gradiente de Bti (Figura 6c) mostró dos bandas que contenían los cristales puros, las cepas que contenían las toxinas Cry4B, Cry11A y Cyt1A, mostraron solamente una banda que contenían los cristales parasporales puros (Figura 6d, 6f y 6e, respectivamente) Se procedió a realizar los bioensayos cuantitativos y posteriormente el análisis PROBIT para determinar las concentraciones letales medias. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Actividad mosquitocida de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217.

	Complejo E-C	CL ₅₀ µg/mL	S	C.V.
a)	LBIT-980	6.53	0.66	10.81
b)	LBIT-1217	13.42	1.44	10.73

	Cristal Puro	CL ₅₀ µg/mL	S	C.V.
c)	LBIT-980	2.85	0.058	2.03
d)	LBIT-1217	3.99	0.33	8.27

E-C: espora-cristal. CL₅₀ µg/mL: concentración letal media en µg/mL. S: desviación estándar. C.V: coeficiente de variación.

Tabla 4. Actividad mosquitocida de las cepas reportadas

	Cristal puro	CL ₅₀ ng/mL	S	C.V.
a)	Bti	6.53	0.49	7.5
b)	Cry4B	298.03	20.08	6.73
c)	Cry11A	277.41	11.3	4.03

CL₅₀ ng/ml: concentración letal media en ng/mL. S: desviación estándar. C.V: coeficiente de variación.

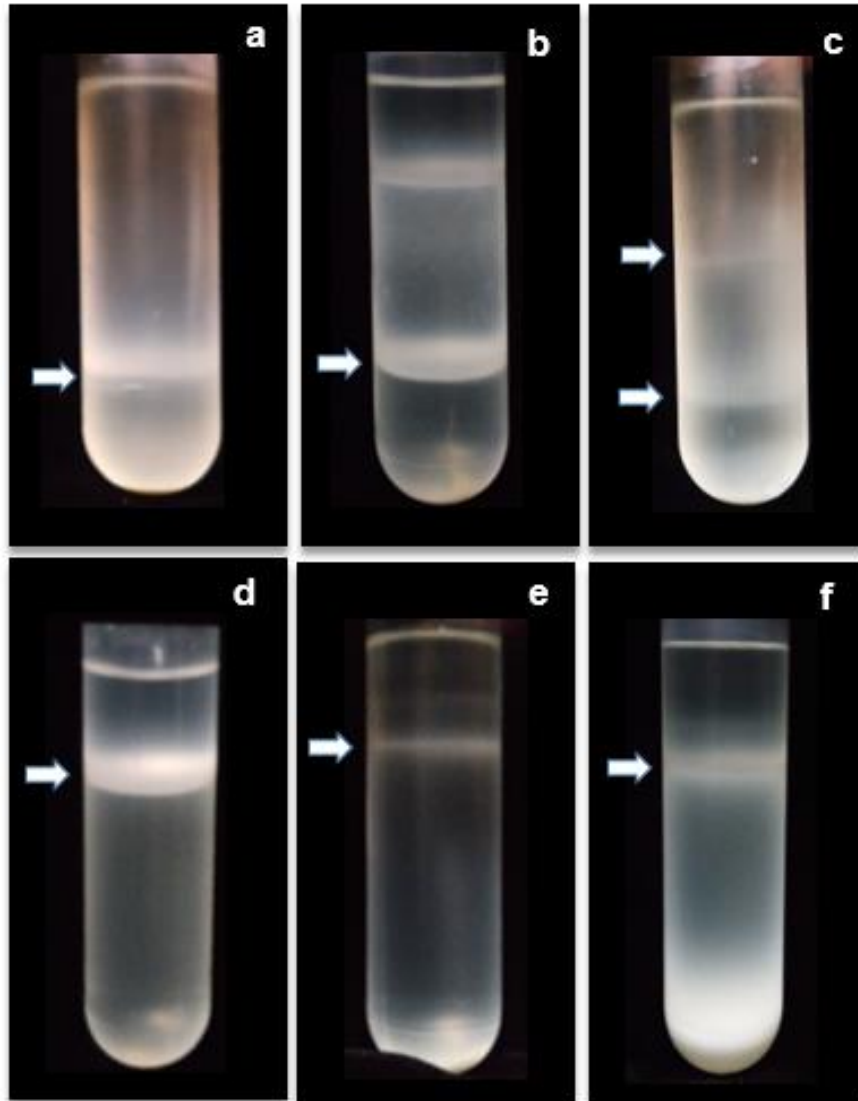


Figura 6. Purificación de los cristales parasporales. Se utilizaron gradientes continuos de bromuro de sodio para separar los cristales de las cepas a) LBIT-980, b) LBIT-1217, c) Bti, d) Cry4B, e) Cyt1A y f) Cry11A. Las flechas indican las bandas de los cristales parasporales puros.

7.1.3 Determinación del sinergismo de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 con la toxina Cyt1Aa.

Una vez que se determinó las concentraciones letales medias de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 se realizaron bioensayos para determinar si estas actuaban de

manera sinérgica con la Cyt1A, como ocurre con otras toxinas mosquitocidas. Se realizaron bioensayos con cuatro concentraciones diferentes, cada uno con su réplica (como se menciona en la metodología). Se realizó el análisis estadístico con la Prueba de Fisher (Prueba F) Los bioensayos realizados con la mezcla de las cepas LBIT-980/Cyt1Aa mostraron que al interactuar ambas cepas ocurría un efecto antagónico (figura 7), mientras que para la mezcla de las cepas LBIT-1217/Cyt1Aa el efecto resulto ser aditivo como se observa en la figura 8.

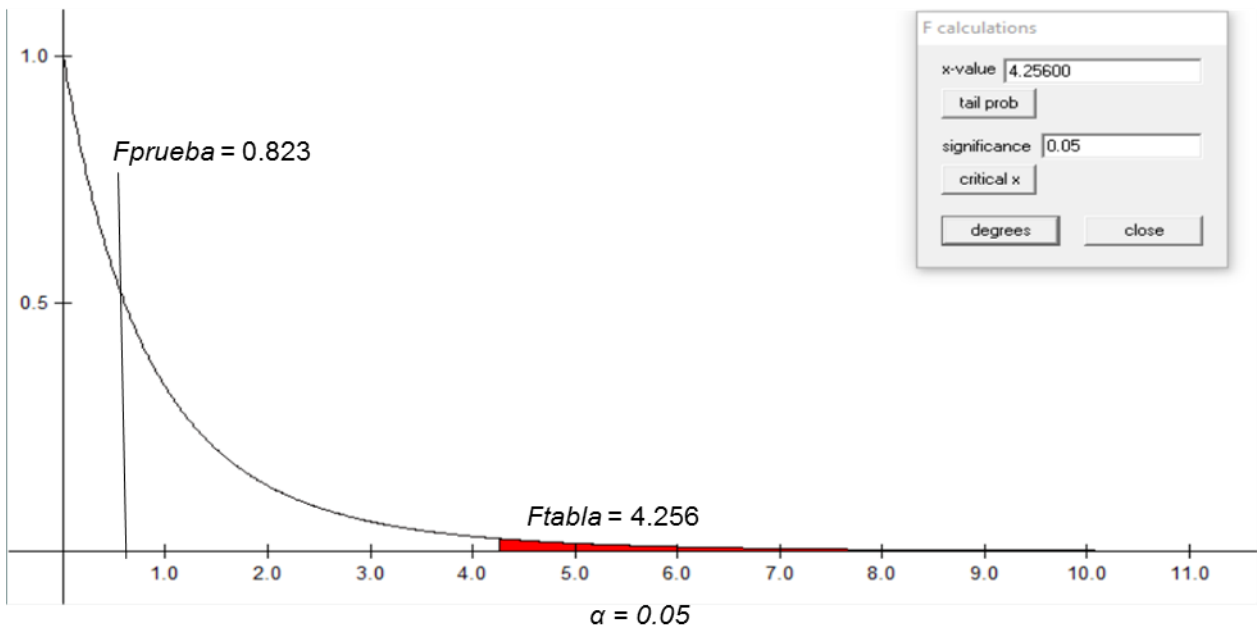


Figura 7. Análisis estadístico de la mezcla de toxinas LBIT-980/Cyt1Aa. De acuerdo con la gráfica como F_{prueba} es menor que F_{tabla} , H_0 se aprueba, por lo tanto, la mezcla de toxinas LBIT-980/Cyt1Aa al interactuar crean un efecto antagónico.

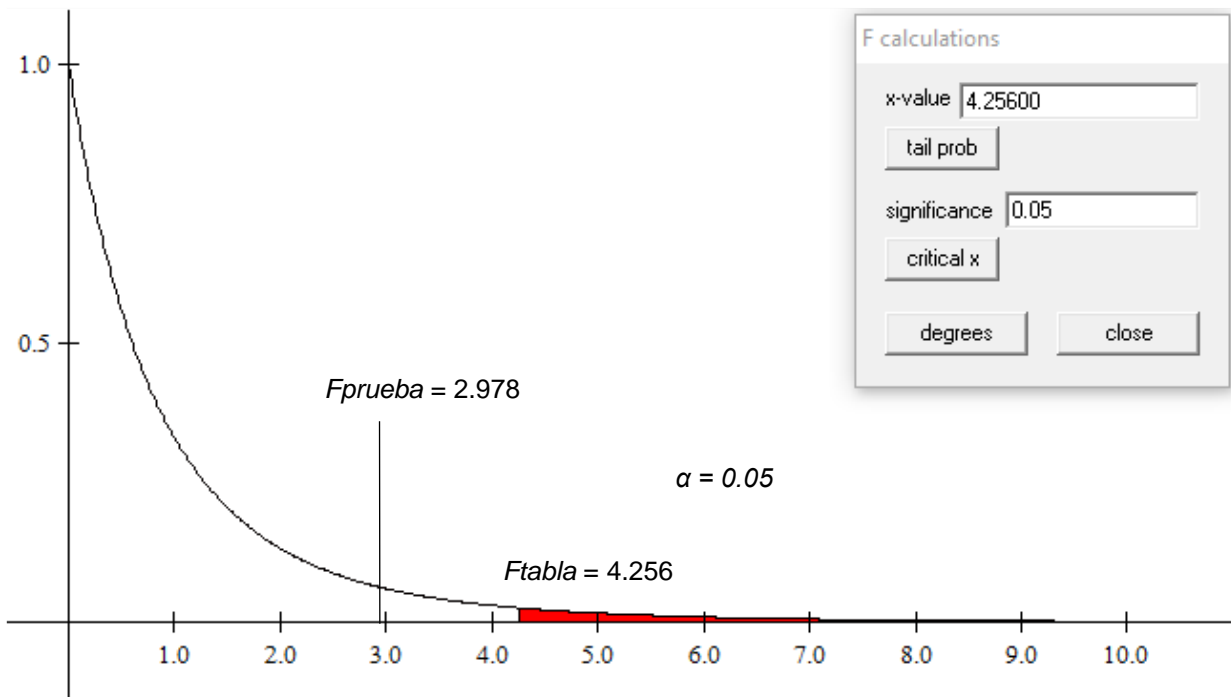


Figura 8. Análisis estadístico de la mezcla de toxinas LBIT-1217/Cyt1Aa. De acuerdo con la gráfica como F_{prueba} es menor que F_{tabla} , H_0 se aprueba, por lo tanto, la mezcla de toxinas LBIT-1217/Cyt1Aa al interactuar crean un efecto aditivo.

7.2 Caracterización de los cristales parasporales de las cepas mosquitocidas

7.2.1 Composición proteica de los cristales parasporales

B. thuringiensis, durante su ciclo de vida, produce un cuerpo parasporal conocido también como cristal, esta característica la distingue de otras especies incluso casi idénticas, como *B. cereus*. Se comprobó que las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 formaban cristales mediante su observación al microscopio de contraste de fases. Una vez observados los cristales, se procedió al análisis de su contenido proteico.

Para el análisis del patrón de proteínas se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), esto permitió separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Para la cepa LBIT-980 se identificó una banda de aproximadamente 70 kDa, que hace referencia a una

proteína truncada, misma que Noguera e Ibarra reportaron en 2010. Asimismo, para la cepa LBIT-1217 se identificó una banda de 130 kDa que coincide con la banda típica de la cepa control HD-73 de cristal bipiramidal (Figura 9).

7.3 Identificación de genes codificantes de δ -ENDOTOXINA

7.3.1 Amplificación de los genes *cry*

Para la identificación de genes *cry* se utilizaron iniciadores universales reportados en 2010 por Noguera e Ibarra. Para la cepa LBIT-1217 se logró la obtención de amplicón (figura 10a) cuando se utilizó los indicadores de los bloques 1-5. El producto de PCR se purificó haciendo uso del kit Quick PRC Purification Kit de Invitrogen.

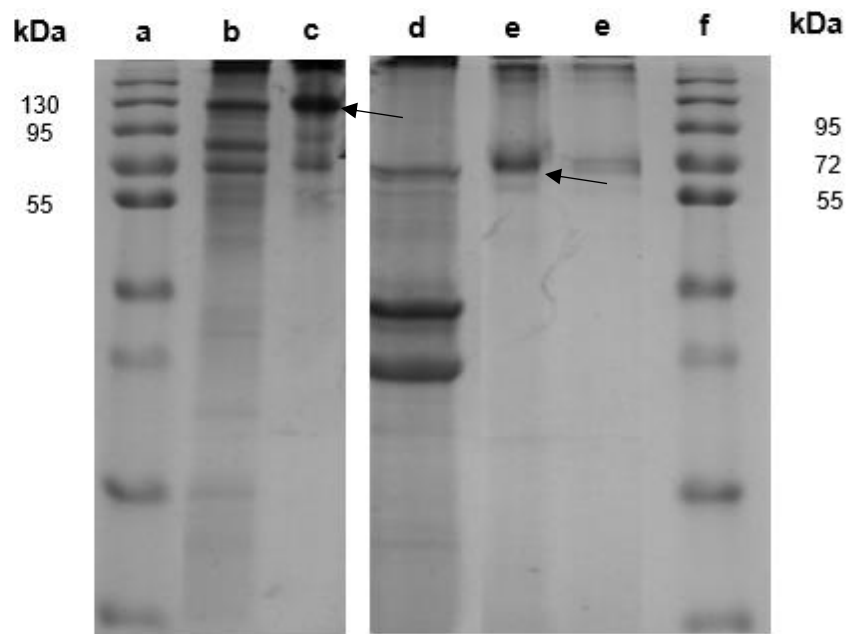


Figura 9. SDS-PAGE de cristales puros de cepas mosquitocidas. a) Marcador de peso molecular, b) HD-73, c) LBIT-1217, d) Bti, e) LBIT-980 y f) Marcador de peso molecular.

7.3.2 Amplificación de los genes *cyt*

Para la identificación de los genes *cyt* se utilizó un par de iniciadores específicos para identificar genes pertenecientes a la subfamilia *cyt1*. Se utilizó el par de iniciadores *cyt* (Tabla 1) bajo las condiciones mencionadas en la metodología (Tabla 2). En la figura 10b se presenta el gel de agarosa con los resultados obtenidos, en él se observan las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 así como el control Bti. Para las cepas mosquitocidas estudiadas no se obtuvo ninguna banda y para el control Bti se obtuvo un fragmento de 900 pb, como se esperaba.

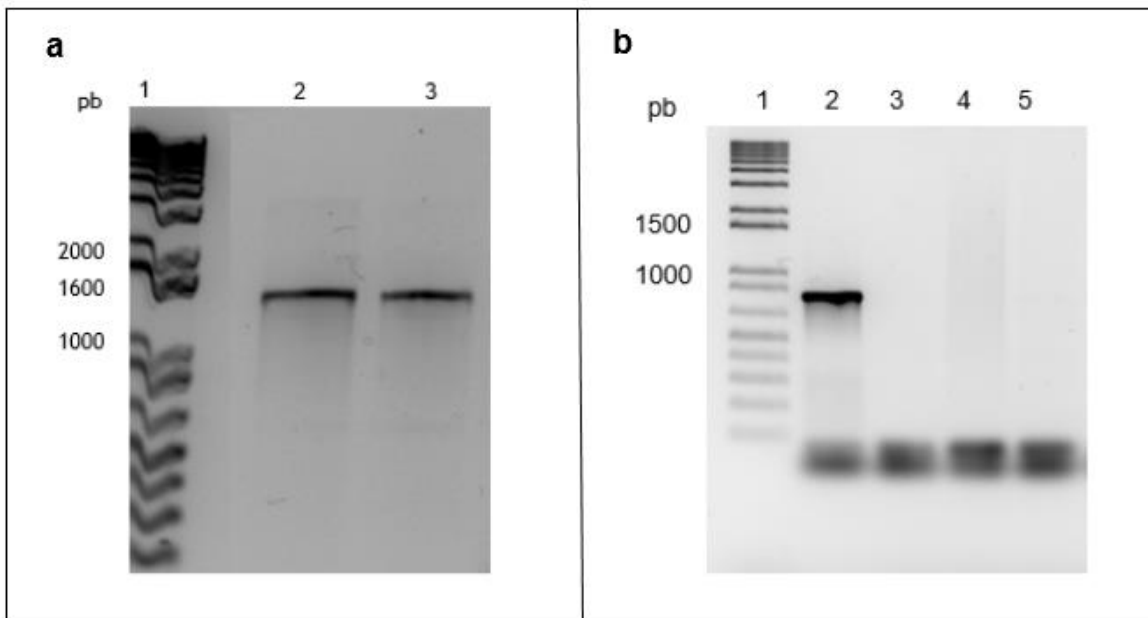


Figura 10. Amplificación de genes *cry* y *cyt* de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217. Geles de agarosa de los productos de PCR con los iniciadores **a) Bloques 1-5:** carril 1, Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder, carril 2, Control HD-1 y carril 3, LBIT-1217. **b) Iniciadores *cyt*:** carril 1, Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder, carril 2, Control Bti, carril 3, Control HD-73, carril 4, LBIT-980 y carril 5, LBIT-1217.

7.3.3 Secuenciación de los productos de PCR

Una vez que se purificó el producto de PCR de la cepa LBIT-1217, para obtener la secuencia del amplicón se utilizaron los mismos iniciadores utilizados anteriormente en la reacción de PCR.

Al realizar el análisis comparativo de la secuencia obtenida para la cepa LBIT-1217 con el par de bloques 1-5, presentó cierto nivel de identidad con las secuencias *cry* reportadas. Se realizó el análisis NCBI-Blastx donde los resultados mostraron que la cepa LBIT-1217 presentó un porcentaje de identidad del 76% con la secuencia del gen *cry1C* (Figura 11).

1217	106	TTACCGAAATCTACTCCCTAGATTGGATAACATCTGATCAATTACGGGAGAGACTTCTTGTGCT
Cry1Cb	113	TTACCGAAATCTACTGATCAAGATTGGATAACATAAATCGATTACGGGAGAGACTTAACATTGA
Cry1Ca	113	TTACCGAAATCTACTGATCAAGATTGGATAACATAAATCGATTACGGGAGAGACTTAACATTGA
Cry1Ca6	113	TTACCGAAATCTACTGATCAAGATTGGATAACATAAATCGATTACGGGAGAGACTTAACATTGA

Figura 11. Alineación de secuencia múltiple del amplicón de los genes *cry* conservados.
Se realizó el análisis NCBI-Blastx con la secuencia del amplicón que se obtuvo al utilizar los iniciadores de los bloques 1-5 con la cepa LBIT-1217

7.4 Caracterización molecular de las cepas mosquitocidas LBIT-980 y LBIT-1217

7.4.1 Secuenciación de los genes de la flagelina de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217

Para obtener la secuencia del gen de la flagelina de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217, se amplificó por PCR para lo cual se emplearon los oligonucleótidos BThag1F y BThat1R (Tabla 1) y las condiciones mencionadas en la metodología. Se realizó una electroforesis en la que se observó que se logró la amplificación de ambas

cepas. Para la cepa LBIT-980 se obtuvo una banda de 1000 pb, mientras que para la cepa LBIT-1217 se amplificó un fragmento de 1500 pb (Figura 12). La secuencia del amplicón se obtuvo haciendo uso de los iniciadores que se emplearon en la reacción de PCR.

Se analizaron las secuencias mediante el análisis de NCBI-Blastx. Para la cepa LBIT-980 se corroboró que efectivamente pertenecía al serovar *kim* (Figura 13a), mientras que para cepa LBIT-1217 se seleccionaron 4 secuencias con las que se realizó una reconstrucción filogenética por el procedimiento neighbor-joining. En la figura 13b se observa que la cepa LBIT-1217 es muy parecida a la especie de *Bacillus weihenstephanensis*. Sin embargo, de acuerdo a la morfología que presenta el cristal y al análisis de la proteína existe mayor posibilidad que esta cepa pertenezca al serovar *kurstaki*.

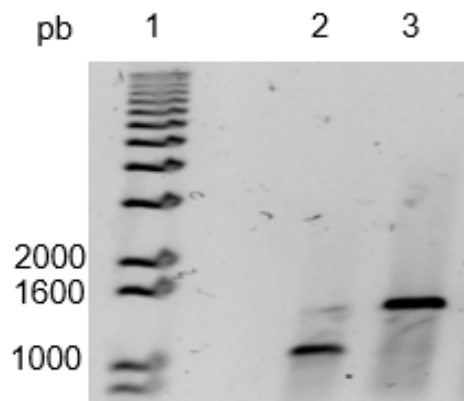


Figura 12. Amplificación de la subunidad *hag* de la flagelina de *B. thuringiensis* en un gel de agarosa. Carril 1 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder, Carril 2, LBIT-980, Carril 3, LBIT-1217.

a

Bacillus thuringiensis serovar kim strain IEBC-T52 001 flagellin (hag) gene, partial cds
Sequence ID: [gb|DQ377280.1](#) Length: 978 Number of Matches: 1

Range 1: 45 to 908 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Mi

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1591 bits(861)	0.0	863/864(99%)	0/864(0%)	Plus/Minus

b

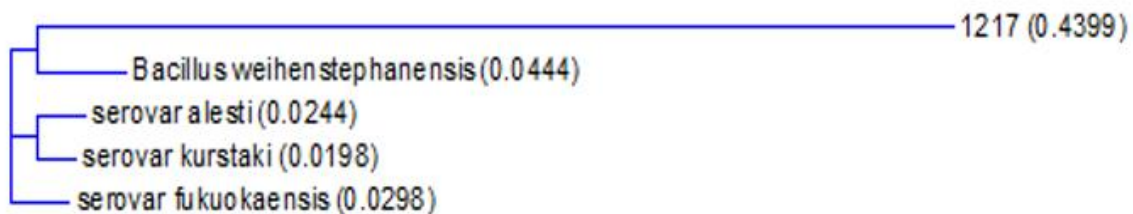


Figura 13. Análisis del amplicón de la subunidad hag de la flagelina de *B. thuringiensis*.
a) LBIT-980. b) Árbol filogenético de la cepa LBIT-1217 a partir del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la subunidad hag por el método neighbor-joining.

7.4.2 Análisis del patrón de plásmidos de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217

Se realizó la extracción de plásmidos de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 y de los controles Bti y HD-73. Los aislados se sometieron a electroforesis (como se menciona en metodología), la cepa LBIT-980 muestra la presencia de un plásmido de 16 kb y uno mayor. Éstos son característicos de los serotipos kim; por otra parte, la cepa LBIT-1217 mostró la presencia de 3 plásmidos uno de 8kb, otro más de 12 kb y uno mayor a los 16kb (Figura 14).

7.4.3 Análisis de los cristales de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 por microscopía electrónica de barrido

Para conocer de manera más detallada la morfología de los cristales parasporales de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 de *B. thuringiensis*, se observó por microscopía

electrónica de barrido, como se indica en metodología. La cepa LBIT-980 presentó cristales parasporales en forma de esfera colapsada (Figura 15a), mientras que la cepa LBIT-1217 mostró cristales parasporales de forma piramidal (figura 15b).

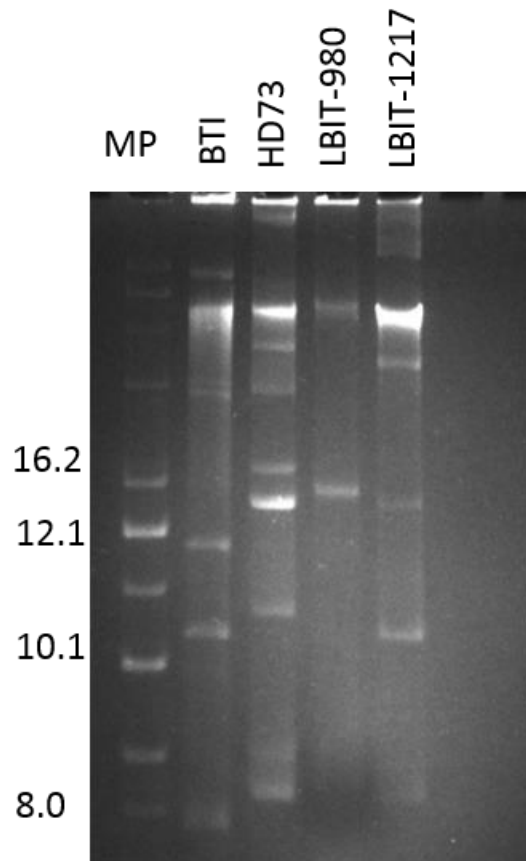


Figura 14. Patrón de plásmidos de las cepas mosquitocidas de *B. thuringiensis* en un gel de agarosa. Carril 1, Marcador de peso molecular (supercoiled), Carril 2, Cepa control Bti, Carril 3, Cepa control HD-73, Carril 4, Cepa LBIT-980 y Carril 5, Cepa LBIT-1217.

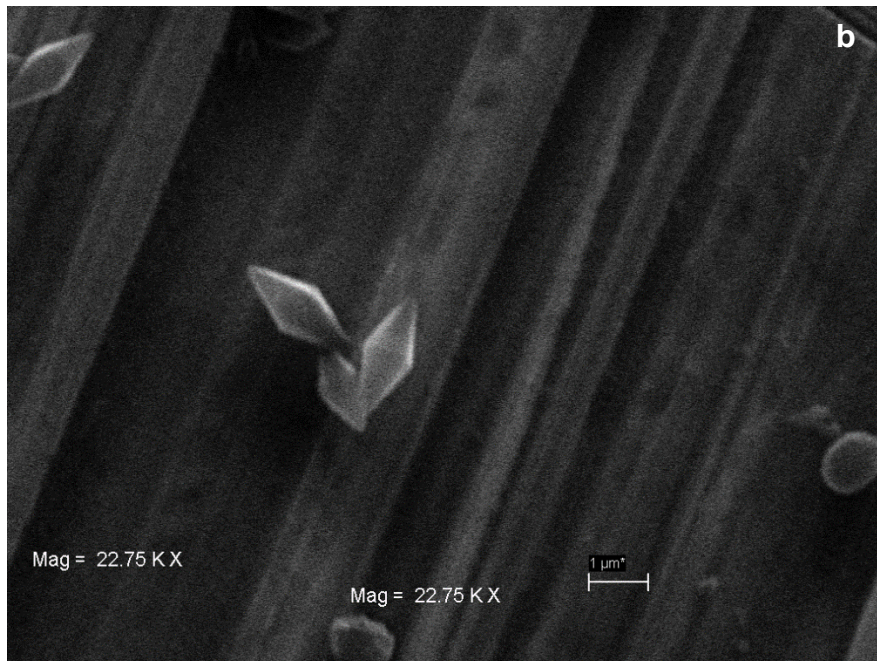
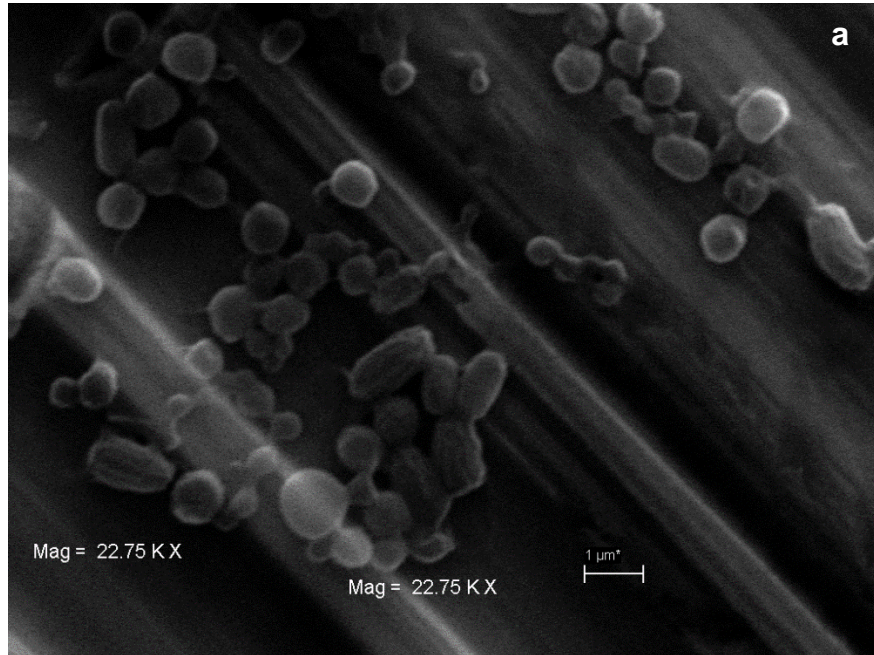


Figura 15. Microscopía electrónica de barrido de las cepas mosquitocida de *B. thuringiensis*. a) LBIT-980 y b) LBIT-1217.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró analizar dos cepas atípicas de *Bacillus thuringiensis*, una de ellas la cepa LBIT-980 que se aisló del suelo, perteneciente al serovar kim y que en 2010 Noguera e Ibarra reportaron que contenía la proteína Cry59Aa; la segunda cepa LBIT-1217 aislada de lombricomposta. Curiosamente varias de las cepas que se encontraron en el humus presentaban actividad mosquitocida, al analizar la cepa LBIT-1217 en el microscopio por contraste de fases, se observó que contenía cristales parasporales en forma bipiramidal. Se realizaron bioensayos con diferentes tipos de insectos y se determinó que la cepa LBIT-980 presentaba actividad mosquitocida (Gutiérrez., 2008). Se determinó la CL₅₀ de las cepas y se comparó con la CL₅₀ de toxinas mosquitocidas reportadas, para posteriormente analizarlas por diferentes métodos moleculares de caracterización. Estos resultados permitieron cumplir con el objetivo principal del trabajo, que era caracterizar las cepas y determinar el nivel de toxicidad individual que presentan, para poder compararlos con las toxinas mosquitocidas conocidas.

Bacillus thuringiensis serovar *israelensis* (Bti) muestra una elevada toxicidad sobre larvas de dípteros, principalmente en mosquitos, además que es una de la subespecie de *Bacillus thuringiensis* que es activa sobre los tres géneros de mosquitos *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*. La toxicidad que Bti presenta se debe a la cantidad de proteínas por la que está conformada, ya que cuenta con cuatro toxinas Cry y una toxina Cyt, esta última ha destacado entre las proteínas que conforman a Bti, porque se sabe que al interactuar con toxinas Cry produce un efecto de sinergismo (Thomas-Ellar.,1993; Wu-Chang., 1985). El cuerpo parasporal de Bti es de las toxinas más conocidas ya que su concentración letal media (CL₅₀) oscila alrededor de los 10 ng/mL (Crickmore *et al.*, 1995).

Interesantemente las cepas mostraron tener una concentración letal media (CL₅₀), comparable con las toxinas Cry que forman parte de Bti; al realizar los bioensayos con cristales parasporales puros, se determinó una CL₅₀ de 2.85 µg/ml y 3.99 µg/ml para LBIT-980 y LBIT-1217, respectivamente. Al comparar estos resultados con las proteínas Cry de Bti por separado, los resultados fueron de 277 ng/ml y 298 ng/ml para las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, respectivamente. Sorprendentemente cuando se realizó la mezcla de los cristales parasporales de LBIT-980 y LBIT-1217 con Cyt1Aa los resultados indicaron que cuando se mezcló LBIT-980/Cyt1Aa la mezcla fue menos tóxica que lo que se esperaba por lo que el efecto resultante parece indicar que ocurrió un antagonismo, mientras tanto la mezcla de LBIT-1217/Cyt1Aa indica que sólo ocurrió un efecto aditivo. Aunque reportes señalan que la mezcla de Cyt con otras toxinas Cry producen un efecto sinérgico, es decir la actividad tóxica de la mezcla de toxinas Cry con Cyt es mucho mayor que la suma de sus actividades individuales (Pérez et al., 2005). Es importante realizar más pruebas, donde se pueda utilizar la metodología empleada por Tabashnik (1992). Esto es importante hacer notar, ya que las diferentes técnicas para medir la acción conjunta de toxinas no fueron seguidas y es imperativo que estas observaciones sean tomadas como preliminares.

Para apoyar la caracterización de las cepas de *B. thuringiensis* es necesario analizar varios parámetros. Uno de estos es el patrón de proteínas del cristal parasporal (Höfte y Whiteley, 1989). Una vez que se confirmó que la toxicidad es debido a los cristales parasporales, el análisis proteico se vuelve fundamental. Se obtuvo el perfil proteico de los cristales parasporales donde se logró identificar una banda de 130 kDa para LBIT-1217, proteína típica de cristales bipiramidales. Para la cepa LBIT-980 el patrón de proteínas mostró una banda de 70 kDa que hace referencia a una proteína truncada y a la proteína Cry59Aa reportada por Noguera e Ibarra (2010).

Para confirmar la identidad y composición de las δ-endotoxinas contenidas en los cristales parasporales de las cepas de estudio, se realizaron amplificaciones por

PCR para determinar qué genes eran responsables de la actividad mosquitocida. Los resultados muestran que la cepa LBIT-1217 contiene una proteína parecida a Cr1C (Cry1C-like), ya que la secuencia mostró un 76% de identidad con esta proteína, por lo que es recomendable terminar de secuenciar el gen completo, sin dejar de lado la posibilidad de estar frente a la presencia de una nueva proteína y que mantenga actividad mosquitocida. Se sabe que las proteínas Cry1 presentan actividad hacia insectos de la clase lepidóptera (Feitelson *et al.*, 1992) es interesante encontrar una nueva proteína Cry1 que muestre actividad mosquitocida. Ninguna de las cepas mostró la presencia de la toxina Cyt1Aa, lo cual indica que efectivamente las proteínas Cry que contienen las cepas de estudio tienen actividad mosquitocida por sí solas.

Las secuencias de la flagelina de la cepa LBIT-980 mostró un 100% de identidad con la secuencia de la flagelina de *B. thuringiensis* serovar *kim*, mientras que la cepa LBIT-1217 mostró ser compatible con la especie de serovar *kurstaki*, aunque al realizar el árbol filogenético esta mostró mayor compatibilidad con la especie de *B. weihenstephanensis*. Sin embargo, es importante realizar nuevamente la técnica de Xu y Côté (2008) para poder dejar de manera más clara si efectivamente se está hablando de una cepa con actividad mosquitocida perteneciente al serovar *kurstaki* o tenemos la presencia de un nuevo serovar.

En el 2008, Reyes-Ramírez e Ibarra realizaron una clasificación de cepas de *B. thuringiensis* partiendo del hecho que la bacteria presenta una gran variedad de plásmidos, de esta forma, toma en cuenta una relación indirecta de su patogenicidad con su genoma. Los autores concluyen que esta técnica permite inferir posibles relaciones filogenéticas debido a la presencia de un patrón de plásmidos ancestral para cada serotipo. En este trabajo se realizó la identificación del patrón de plásmidos para las cepas mosquitocidas, y los resultados indicaron que la cepa LBIT-980 presento plásmidos que están presentes en el serovar *kim*, mientras que LBIT-1217 muestra la presencia de cuatro plásmidos, dos de más de 16 kDa y dos

más con pesos aproximados de 10.5 y 14 kDa, parecidos a los que están presentes en el serovar *kurstaki*. Al realizar una comparación entre la secuencia de la flagelina de las dos cepas, se dedujo que se trata de cepas que no están muy relacionadas entre sí y esto fue confirmado al observar que los patrones de plásmidos son completamente distintos, por lo que al menos en este estudio la patogenicidad, el patrón de plásmidos y la secuencia de la flagelina no muestran que haya relación entre las dos cepas estudiadas.

Los cristales parasporales mostraron una morfología no muy común en cepas mosquitocidas; por ejemplo, el componente principal insecticida de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* es un cristal parasporal de forma semi-esférica (Federici *et. al.*, 1990); mientras que otras subespecies de *B. thuringiensis* con actividad mosquitocida presentan un cristal amorfo; para la cepa LBIT-980 la morfología del cristal es una esfera colapsada y para LBIT-1217 la morfología del cristal fue de forma bipiramidal, hasta el día de hoy no existe reporte alguno de alguna subespecie de *B. thuringiensis* que sea en estructura de forma bipiramidal.

Con las evidencias mostradas en este trabajo, se llega a la conclusión que la hipótesis propuesta se rechaza ya que al realizar las mezclas con las cepas mosquitocidas estudiadas y la toxina Cyt1Aa no presentaron un sinergismo. Muy por el contrario, presentaron efecto de antagonismo y aditivo. Sin embargo, es imperativo llevar a cabo más pruebas de acción conjunta para corroborar o rechazar esta conclusión, pero se logró cumplir con el objetivo que era caracterizar las cepas mosquitocidas estudiadas y medir su nivel de toxicidad para poder compararlo con las toxinas mosquitocidas reportadas. Es importante que se continúe con la secuenciación completa del gen Cry1C-like para poder determinar si se trata de la presencia de una nueva toxina.

Otros estudios reportan que Bti es el agente mosquitocida más utilizado para controlar la propagación de mosquitos transmisores de enfermedades como Dengue, Zika, Paludismo, entre otras. Es el que mayor toxicidad presenta gracias a la mezcla de toxinas por las que está conformada: cuatro toxinas Cry y dos toxinas Cyt. Esta última se ha reportado que provoca un efecto sinérgico con las otras toxinas Cry. A la fecha no existe reporte alguno sobre resistencia de mosquitos a Bti. Sin embargo, es importante buscar cepas nativas con actividad mosquitocida para contar con un arsenal de éstas en caso de que llegara a reportarse resistencia a las ya utilizadas en el mercado.

9. CONCLUSIONES

1. Los cristales parasporales puros de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 de *B. thuringiensis* mantienen toxicidad hacia larvas de *Aedes aegypti*.
2. Los cristales parasporales de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 presentan toxicidad significativa de 2.85 µg/mL y 3.99 µg/mL respectivamente al compararse con las toxinas mosquitocidas Cry4B (298.03 ng/mL) y Cry11A (277.41 ng/mL).
3. La toxina Cry59Aa, al interactuar con la toxina Cyt1Aa producen un efecto antagónico
4. La toxina de la cepa LBIT-1217, al interactuar con la toxina Cyt1Aa produce un efecto aditivo.
5. La cepa LBIT-1217 mostró la presencia de una proteína de 130kDa.
6. La secuencia de la amplificación para genes *cry* de la cepa LBIT-1217 mostró un 76% de identidad con el gen Cry1C.
7. La secuencia de la subunidad hag de la flagelina de *Bacillus thuringiensis* indicó que la cepa LBIT-1217 tiene porcentaje de identidad del 70% con serovar kurstaki, sin embargo, al realizar el árbol filogenético muestra ser más cercana con la especie de *Bacillus weihenstephanensis*.

10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Realizar la secuenciación completa del gen codificante de la proteína putativa Cry1C de la cepa LBIT-1217 de *B. thuringiensis*.
2. Realizar más pruebas, incluyendo la caracterización de la subunidad *hag* de la flagelina de *B. thuringiensis* para determinar el serovar de la cepa LBIT-1217.
3. Realizar bioensayos con las cepas mosquitocidas y la Cyt1Aa utilizando la metodología empleada por Tabashnik.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aronson , A.I., W. Beckman y P. Dunn. (1986). ***Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens.** Microbiol. Reviews. 30: 1–24.
- Baum, J.A. y J.M. González Jr. (1992). **Mode of replication, size and distribution of naturally occurring plasmid in *Bacillus thuringiensis*.** FEMS Microbiol. Letts. 96: 143–148.
- Bravo, A., I. Gomez, J. Conde, C. Munoz-Garay, J. Sanchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. Gill y M. Soberon (2004). **"Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains."** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1667: 38-46.
- Bulla, L., D. Bechtel, K. Kramer, Y. Shethna, A. Aronson y P. Fitz-James (1980). **"Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*."** Critical reviews in microbiology 8: 147-204.
- Bulla, L., D. Bechtel, K. Kramer, Y. Shethna, A. Aronson y P. Fitz-James (1980). **"Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*."** Critical reviews in microbiology 8: 147-204.
- Casida J. E. and Quistad G. B. (1997). **Safer and more effective insecticides for the future.** Modern Agriculture and the Environment 71:3–15.
- Crickmore, N., D. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D. Dean (1998). **"Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins."** Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 807-813.
- de Barjac and D. J. Sutherland (), **Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*.** Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
- de Barjac H. y Bonnefoi A. (1962). **Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de bacillus du type *B. thuringiensis*.** Entomophaga 7:5-31.

- DeLucca II, A.J., J.G. Simonson y A.D. Larson. (1981). ***Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States**. Can. J. Microbiol. 27:865–870
- Edelman R. (2007). **Dengue vaccines approach the finish line**. *Clinical Infectious Diseases*, 45(Suppl 1): S56–S60.
- Federici, B. A., P. Lüthy, and J. E. Ibarra. (1990). **The parasporal body of BTI; structure, protein composition, and toxicity**, p. 16-44. In H.
- Feitelson J. S., Payne J. y Kim L. (1992). ***Bacillus thuringiensis*: insects and Beyond**. BioTechnology. 10:271-275.
- Glare, T.; O'Callaghan, M. 2000. ***Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety**. John Wiley, Chichester, U.K., 350 p. 2002. van Frankenhuyzen, K. Biocontrol Science and Technology 12: 277-281.
- Goldberg, L. J., Margalit, J. 1977. **A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens***. Mosquito News 37:355-358.
- Gómez, I., J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo and M. Soberón (2002). **"Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin."** FEBS letters 513: 242-246.
- González J.M. and B.C. Carlton. 1980. **Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis***. Plasmid. 3: 92–98.
- Grochulski P., Masson L., Borisova S., Pusztai-Carey M., Schwartz J. L., Brousseau R., and Cygler M. (1995). ***Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation**. J. Mol. Biol. 254:447-464.
- Gutierrez, A. 2008. **Evaluación de la actividad tóxica de cepas atípicas de *Bacillus thuringiensis* hacia insectos de los órdenes Lepidoptera, Díptera y Coleóptera**. Tesis de Ingeniería. División de Agronomía. Universidad Autónoma Antonio Narro. Saltillo, Coah.
- Guzman, G., Kouri, G., 2002. **Dengue: an update**. Lancet Infect. Dis. 2, 33–42.
- Höfte, H., and H.R. Whiteley. 1989. **Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis***. Microbiol. Reviews. 53: 242–255.

- Ibarra, J. E. and B. A. Federici (1986). "**Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis.**" Journal of bacteriology 165: 527-533.
- Ibarra, J.E. and B.A. Federici. 1987. **An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes.** Journal of the American Mosquito Control Association. 3(2): 187–192.
- Ibarra, J.E., Del Rincón, M.C., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C.M., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Sánchez, J., Peña, G., Bravo, A., 2003. **Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species.** Appl. Environ. Microbiol. 69, 5269-5274.
- Khyami-Horani, H., Hajaj, M. y Charles, J. F. 2003. **Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *jordanica* (serotype H71), a novel serovariety isolated in Jordan.** Curr Microbiol 47(1): 26-31.
- Knowles, B. H. (1994). "**Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins.**" Adv. Insect Physiol 24: 275-308.
- Laemmli U. K. (1970). **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature. 227:680-685.
- Lambert B. and Peferon M. (1992). **Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*.** BioScience. 42:112-122.
- Lecadet M. M., Frachon E., Dumanoir V. C., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P. and Thiéry I. (1999). **Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*.** J. Appl. Microbiol. 86:660–672.
- Lemus ER, Estevez G, Velazquez JC. **Campana por la Esperanza. La Lucha contra el Dengue (El Salvador, 2000).** La Habana, Editors Politica, 2002.
- Li J., Carroll J. and Ellar D. J. (1991). **Crystal structure of insecticidal deltaendotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution.** Nature. 353:815821.

- Liu, Y.-T., M.-J. Sui, D.-D. Ji, I. Wu, C.-C. Chou and C.-C. Chen (1993). "**Protection from Ultraviolet Irradiation by Melanin of Mosquitocidal Activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.**" Journal of invertebrate pathology 62: 131-136.
- López-Meza J., Federici B., Poehner W., Martínez-Castillo A. and Ibarra J. (1995). "**Highly Mosquitocidal Isolates of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae* and *entomocidus* from Mexico.**" Biochem. Syst. Ecol. 23:461-468.
- Lu, H., F. Rajamohan and D. H. Dean (1994). "**Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*.**" Journal of bacteriology 176: 5554-5559.
- McLaughlin, R.E., Dulmage, H.T., Alls, R., Couch, T.L., Dame, D.A., Hall, I.M., Rose, R.I. and P.L. Versoi. 1984. U.S. **Standart Bioassay for the Potency Assessment of *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 Against Mosquito Larvae.** Bulletin of E.S.A. 30: 26 -26
- Nester, E.W., L.S. Thomashow, M. Metz and M. Girton. 2002. **100 years of *Bacillus thuringiensis*, a Critical Scientific Assesment,** ASM/Washington. D.C.
- 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. 76:6150-6155.
- Organización Mundial de la Salud. **Declaración de la OMS sobre las enfermedades transmitidas por vectores** (febrero 2016). [Acceso 6 de Junio 2016] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387>
- Porcar M. and Juárez-Pérez V. M. (2003). "**PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes.**" FEMS Microbiol. Rev. 26:419-432.
- Reyes-Ramírez A. and Ibarra J. E. (2008). "**Plasmid pattern of *Bacillus thuringiensis* type strains.**" Appl. Environ. Microbiol. 74:125 - 129.
- Rigau-Perez JG et al. **Dengue and dengue haemorrhagic fever.** *Lancet*, 1998, 352:971–977.

- Roh, J.Y., J.Y. Choi, M.S. Li, B.R. Jin and Y.H. Je. 2007. ***Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control.** J Microbiol. Biotechnol. 17: 547–559.
- Rosso M. L. and Delécluse A. (1997). **Distribution of the insertion element IS240 among *Bacillus thuringiensis* strains.** Curr. Microbiol. 36:348-353.
- Samanidou-Voyadjoglou A., Roussis V., Petrakis P. V. (2007). **Control biológico de poblaciones de mosquitos: aspectos aplicados de control de plagas mediante enemigos naturales.**
- Sauka, D. H. and G. B. Benintende (2008). **"*Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas."** Revista argentina de microbiología 40: 124-140.
- Schnepf, E., N Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean.1998. ***Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins.** Microbiol and Mol Biol. Reviews. 62: 775 – 806.
- Secretaria de Salud Pública. **Situación Nacional de enfermedades transmitidas por vectores.** (Enero 2016). [Acceso 31 de Marzo 2016] Disponible en: http://tie.inspvirtual.mx/etv_2016/.
- Swamy H. M., Asokan R., Rajasekaran P. E., Mahmood R, Nagesha S. N. and Arora D. K. (2012). **Analysis of Opportunities and Challenges in Patenting of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein Genes.** Recent. Pat. DNA Gene Seq. 6:64-71.
- West, A. W., H. Burges, R. White and C. Wyborn (1984). **"Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil."** Journal of invertebrate pathology 44: 128-133.
- Whalon M. E. and Wingerd B. A. (2003). **Bt: Mode of Action and Use Archives of insect.** Arch. Insect. Biochem. Physiol. 54:200-211.
- Whiteley, H.R. and E. Schnepf. 1986. **The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*.** Ann Rev. 40: 546 - 576.
- Wirth M. C., Jiannino JA., Federici B. A., Walton W. E. (2005). **Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* or a mixture of *B. sphaericus***

+Cry 1A from *Bacillus thuringiensis* in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Invertebrate Pathology 88. 154-162.

Xu D. and Côté J. (2008). **Sequence diversity of *Bacillus thuringiensis* flagellin (H antigen) protein at the intra-H serotype level.** Appl. Environ. Microbiol. 74: 5524 - 5532.

Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, R. Taussig and L. A. Bulla Jr (2006). **"A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*."** Science Signaling 103: 9897.

12. APENDICE

12.1 Secuencias en nucleótidos de la cepa LBIT-1217 de los amplicones de la δ -endotoxina con Bloques 1-5 para proteínas Cry

GAAGATGGGCATTGACACCTGCATGTCTATGAAGACGTTCAATTTACCCCTTAT
GCTCTGGATTAATTTCGCTGATCACTGTNTTACTCGTNCATCTGTCATTATGAAT
TTACCGAAATCTACTCCCCTAGATTGGATAACATCTGATCAATTACGGAGAGA
CTTCTTGTGCTCGTCTTAGATATGATGCCTTTCCTGCCAAACCTTTACCTTGGG
AGATCTTCCTGTCAGCCTATTGGACTCCTAAACGGGGAAGTTTATACAGAGCC
GAAAATTAATTTAATCCAGAGATACAGTCTGTACCTCAGTTTCCTACTTTTAA
CGTTCCCCACAGCAACACCCTGGTCAATCCTCGTTTATTTGACCCCCCAATA
ATCTTACCCTCTTTACAGATGGGTTTAATGTTGGACCCCTTTATCATTGGGGA
GGACATCAGTTGCATATCTAATGCTTATAGGAAGTGGTAACATAACATCTCCTA
AATATGGAACAAAAGCTAACCCACGAACCTCCCATAACCTTTACTATTAATGGAT
CCTTCTTTAGGAGGTTCACTAATCTTCTCTTGGCATTATTCCGTTAACCAATCN
CNGGACCTCTTTCTCTTTACGTGNNGNTATNTGGAGGTGTANAAAATTCTNCT
CCTTCANNCCTCCGTAATTAAGGAGGCGCTGGNCAATGTTGCNNTGATAAT
CCGACAGAAGGATNTGATGTAGNCCTTCATACCGGATCTTTNCATGNNANNG
ATCTTGGAGGCTTCTGGTTNNNATCTNGTACATATATNNGAAATGTTATGTGTA
CCACNTCCTATGAAGGCTAGCTANNAGTCNATCTCCNCCCCAATANAAATTGC
GACCGACTCAAAACCANTCCTTAA

12.2 Secuencia en nucleótidos de la cepa LBIT-1217 de los amplicones de la subunidad *hag* de la flagelina de *B. thuringiensis*

ATTTCTTCATCTACATCATCATCTTCAGTAGGAGCAGCAGAAGCAGCTATACTA
GTAGCGTTGCTTGAGTTGTTGTCTAAGTGGTGGTATAGAGAGTTTAAAGAAGA
TCCAAGTTCTGCTCTATTGTGAACAACATTTTCAAGAGCAGTGATCACAGCTG
TTACAGCTGTTGCAGCAGATGTATTAGCTCCATTATTTGATCCTGCAGTAGTA
GCAGTTGATAAAGTAGTTGTTTTTATAGCTGTAGTAATCATTGTGATGATTTTC
GTATCATCATGTGAATCGTCAAATGATTAATGATATCATTTTTCCCACCACCA
CTTAAAAATGCGTTACCATTGAAATTTGTTTTATCAGCAATATGATCAATTTCTT
GTGCTAATGCTTGATACTCTTTGTCCATAGATGCGATATCTTTATCGTTGTTAG
TACCGCTTGATGCTTGTGTTGCAAGATCACGCATACGAAGTAAGATGTTTGAA
ACAGAACCTAATGCAGCGTCACCAGTACGTAAAGCAGACATAGCGTCTTGTGT
GTTACGTGCCCCAACGTTTAATCCGCCTTCTTTGGCACGCATACGAGTAGCAA
TAGCTAAGCCAGCCGCATCGTCAGCTGCACTGTTGATTGATTACCGCTAGATA

