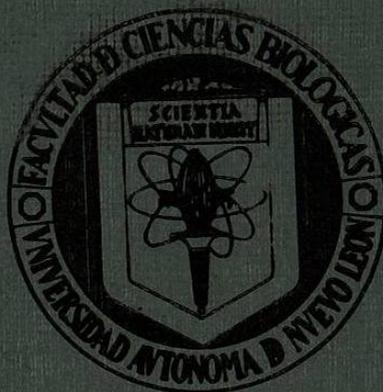


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**SELECCION Y DETERMINACION TOXICA DE CEPAS AUTOCTONAS DE
Bacillus thuringiensis DEL SEROTIPO H-8 CONTRA INSECTOS PLAGA DE
IMPORTANCIA AGRICOLA**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA

BIOL. CARLOS FCO. SANDOVAL CORONADO.

MONTERREY N.L.

OCTUBRE DE 1992

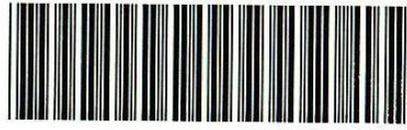
TM

Z53

FCB

199

S2



1020091123

TM
ZS320
FCB
1992
S2

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**SELECCION Y DETERMINACION TOXICA DE CEPAS AUTOCTONAS DE
Bacillus thuringiensis DEL SEROTIPO H-8 CONTRA INSECTOS PLAGA DE
IMPORTANCIA AGRICOLA**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA

BIOL. CARLOS FCO. SANDOVAL CORONADO.

MONTERREY N.L

OCTUBRE DE 1992



FONDO TESIS

24041

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

TITULO: SELECCION Y DETERMINACION TOXICA DE CEPAS AUTOCTONAS DE
Bacillus thuringiensis DEL SEROTIPO H-8 CONTRA INSECTOS PLAGA DE
IMPOTANCIA AGRICOLA

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

BIOLOGO: CARLOS FRANCISCO SANDOVAL CORONADO.

COMISION DE TESIS.

PRESIDENTE:



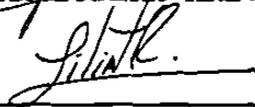
M. en C. LUIS J. GALAN WONG.

SECRETARIO:



M. en C. KATIUSEKA AREVALO NIÑO.

VOCAL:



M. en C. LILIA H. MORALES RAMOS.

DEDICATORIA.

A LA MEMORIA DE MI MADRE GUADALUPE CORONADO Y HERMANA YOLANDA CIPRIANA.

A MI PADRE ANICETO SANDOVAL POR SU GRAN APOYO DURANTE TODA MI VIDA.

CON MUCHO AMOR A MI ESPOSA LUDIVINA MONTEMAYOR Y A MIS DOS GRANDES CARIÑOS, MIS HIJAS: NALLELY ELIZABETH Y YADIRA CAROLINA.

A MIS HERMANOS ARTURO Y JUAN Y HERMANAS ROSARIO Y LUCIA Y A QUIENES ESTAN ALREDEDOR DE ELLOS.

A MIS CUÑADOS: JUAN, CESAR, GLORIA, DELIA Y ESPERANZA.

A TODOS MIS AMIGOS, MUCHAS GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS.

Al M. en C. Luis J. Galán Wong por su apoyo y asesoría del presente trabajo.

A la M. en C. Katiushka Arévalo Niño por su gran amistad, compañerismo y ayuda en la realización del trabajo experimental.

A la M. en C. Lilia H. Morales Ramos por su colaboración en la revisión del escrito.

Al laboratorio de Inmunología por proporcionar las cepas de *B. thuringiensis* para la realización del presente estudio.

Al Departamento de Agricultura de Estados Unidos en especial al Dr Haward T. Dulmage por la donación de las cepas HD utilizadas en la investigación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo por su compañerismo y sobre todo por la gran amistad.

A todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido en mi formación académica y personal

AREA DE TRABAJO.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL:LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y DEL SUELO. DEPTO. DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS. U.A.N.L., BAJO LA DIRECCION DEL M. en C. LUIS J. GALAN WONG.

INDICE

RESUMEN.1
INTRODUCCION.2
HIPOTESIS.	4
ANTECEDENTES.5
MATERIAL Y METODO.	13
1.- Obtención de las cepas.	13
2.- Propagación de las cepas.	13
3.- Recuperación del cuerpo paraesporal.14
4.- Bioensayos con insectos Lepidópteros.	14
5.- Determinación de la potencia.	15
RESULTADOS.16
DISCUSION.	46
CONCLUSION.49
LITERATURA CITADA.	50
ABREVIATURAS.57

RESUMEN

Se seleccionó y determinó la actividad tóxica mediante bioensayos de once cepas GM autóctonas de *B. thuringiensis* del serotipo H-8 y diez cepas clave HD de extractos de fermentación almacenados y obtenidos recientemente contra tres plagas agrícolas importantes como *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens* y *Spodoptera exigua*. Cada cepa se propago en medios a base de Melaza para la producción del complejo de espora-cristal. La extracción de las esporas y cristales se realizó por el método de coprecipitación de Lactosa-Acetona (Dulmage H, 1970).

Los resultados con las cepas GM de *B. thuringiensis* , indican que la mayoría presentó mortalidad inferior al 50 por ciento para los tres insectos evaluados, con excepción de la GM-55 serotipo H-8a8d subespecie *nigeriensis*, el cual presentó 50.58 % en la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ contra larvas de *S. exigua*. Con respecto a las cepas HD, dos cepas del serotipo H-8a8b subespecie *morrisoni* presentaron buena actividad contra larvas de *T. ni*; la cepa HD-116 con 100 % y 15 % de mortalidad con dosis de 500 y 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y la cepa HD-530 con 100 % de mortalidad con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ y 38.66 por ciento de mortalidad con 50 $\mu\text{g/ml}$. Para los extractos almacenados la potencia obtenida en las cepas HD contra larvas de *T. ni*, fue de 4727.56 U.I/mg para HD-116 y 7272.51 U.I/mg para HD-530. En los extractos de fermentación recientes se obtuvo para la cepa HD-116 una potencia de 1018.20 U.I/mg y para la cepa HD-530 una potencia de 2565.86 U.I/mg. Por otra parte, la cepa GM-55 presento una potencia de 3538.18 U.I/mg contra larvas de *S. exigua*.

Se concluye del trabajo, que de las cepas GM evaluadas del serotipo H-8 no existen cepas con alto potencial para el control biológico de los insectos evaluados, sin embargo la que mayor sobresalio fue la cepa GM-55 serotipo H-8a8d subespecie *nigeriensis* contra larvas de *S. exigua*. Dentro de las cepas HD destacan las cepas HD-116 y HD-530 del serotipo H-8a8b subespecie *morrisoni* contra larvas de *T. ni*.

INTRODUCCION.

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva que presenta la capacidad de formar una inclusión cristalina durante la fase de esporulación. El cristal proteico, también es referido frecuentemente como δ -endotoxina o cuerpo paraesporal, el cual resulta tóxico para larvas de diferentes insectos principalmente; Lepidópteros, Dípteros y Coleópteros (Aizawa K., 1987). La característica más atractiva de *B. thuringiensis* es su proteína (cuerpo paraesporal) para usarse en el control de insectos plaga ya que es aquí donde radica su acción tóxica y su especificidad, mientras que miembros de otras órdenes de insectos no son afectados por la proteína del cristal (Aranson, 1986; MacPherson, 1988; Jaquet, 1987; Hofte, 1989; vanFrankenhuyzen, 1990). Actualmente se conocen algunas cepas de *B. thuringiensis* formadoras de cristal proteico con actividad insecticida sin demostrar. Sin embargo, estas proteínas podrían ser tóxicas a algún grupo de insecto, ya que la mayoría de los bioensayos son enfocados solamente en insectos que son fáciles de probar, y que representan una amenaza para la salud humana o son importantes económicamente (Lambert B. and M. Peferoen, 1992).

La inclusión cristalina de *B. thuringiensis* al ser disuelta en el intestino medio de la larva, libera uno o más proteínas de 27 a 140 KiloDaltons (KDa) convirtiéndose en pequeños polipéptidos tóxicos en el intestino medio. La toxina activada interactúa con las células epiteliales del intestino medio del insecto susceptible. Por otra parte, se conoce mediante técnicas electrofisiológicas y bioquímicas, que la toxina genera poros en la membrana celular destruyendo el balance osmótico y como consecuencia la célula pierde agua y posteriormente se lisa. La larva detiene su alimentación y eventualmente muere. Para las toxinas diferentes de *B. thuringiensis* se encuentran sitios de unión específicas con alta afinidad y se ha demostrado que existen sobre el epitelio del intestino medio del insecto susceptible, por lo que puede explicar en parte la especificidad de esta proteína (Hofte, 1989). Recientemente algunos trabajos han mostrado como

desventaja de los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis*, que los insectos pueden desarrollar resistencia al igual que para los insecticidas sintéticos. Se ha demostrado que existe una correlación en la resistencia con una reducción significativa en la afinidad, debido a cambios en los receptores de membrana para la toxina involucrada (Lambert and Peferoen, 1992).

En la aplicación industrial las cepas se someten a un proceso de fermentación bajo condiciones estériles, el caldo de cultivo es concentrado para finalmente preparar un formulado, ya sea de presentación acuosa o un polvo. Este último es formulado con diferentes ingredientes que incluyen dispersantes, surfactantes, humectantes, diluyentes etc. para optimizar las propiedades físicas y estabilizar o aún mejorar la potencia del producto contra la plaga blanco. Las formulaciones más ampliamente usadas para insecticidas bacteriales, incluyen tanto preparaciones secas (polvos, polvos humectables, granulos dispersables humectables) y fluidos acuosos y no acuosos. Aunque los ingredientes usados para formular insecticida a base de bacterias son los mismos a los utilizados para las formulaciones químicas, el formulador debe considerar diferencias entre los dos, tal como el tamaño de partícula, cantidad de proteína tóxica y espora bacterial e impurezas de la fermentación (Daoust A.R.1989).

Estos anteriores aspectos han aumentado el interés en esta bacteria y su cristal proteico en los últimos años, ya que diversos programas de investigación se están llevando a cabo por grupos diferentes para encontrar cepas de *B. thuringiensis* con nuevo espectro insecticida, es importante señalar que dentro del serotipo H-8 (Tabla 4) se encuentran cepas con diversas propiedades entomopatógenas contra tres órdenes de insectos importantes tales como; Díptera, Lepidóptera y Coleóptera. Por lo anterior, nuestro trabajo pretende seleccionar y determinar la actividad tóxica entre cepas autóctonas de *B. thuringiensis* del serotipo H-8 contra insectos plaga de importancia agrícola, así como comparar la toxicidad contra otras cepas de colección pertenecientes al mismo serotipo.

HIPOTESIS.

ES PROBABLE ENCONTRAR UNA CEPA NATIVA DE *Bacillus thuringiensis*
DEL SEROTIPO H-8 CON ACTIVIDAD TOXICA PARA INSECTOS LEPIDOPTEROS
CON ACTIVIDAD IGUAL O SUPERIOR A LOS PRODUCTOS COMERCIALES
ACTUALMENTE ENCONTRADOS EN EL MERCADO.

ANTECEDENTES.

Dentro del serotipo H-8 de las cepas de *B. thuringiensis* se encuentran presentes tres patotipos importantes ya que presentan actividad tóxica hacia tres órdenes de insectos como Lepidópteros, Dípteros y Coleópteros, encontrándose cepas como la G-2 y morrison, PG-14 y BI 2586 respectivamente. El cristal paraesporal de los tres patotipos difieren en morfología, patron de proteína y serología (Krieg et.al., 1987).

ACTIVIDAD DE CEPAS DE *B. thuringiensis* SEROTIPO H-8 CONTRA INSECTOS DIPTEROS.

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* que presentan mayor actividad contra insectos dípteros se encuentran la subespecie *israelensis* del serotipo H-14 y la cepa PG-14 perteneciente a la subespecie *morrisoni* del serotipo H-8. Estudios comparativo, indican que las dos cepas pertenecen a diferentes subespecies y serotipo respectivamente. Su propiedad mosquiticida, es debido a un complejo similar de proteínas producidas durante la esporulación, en ambas contienen cuatro proteínas principales con peso molecular de 27.3, 65, 128 y 135 KiloDaltons (KDa). Además, se ha observado reacción inmunológica cruzada con las proteínas de 65 y 27.3 KDa y la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína difiere solamente en un nucleótido (Gill et al, 1987; Galjart, 1987).

Aunque el cuerpo paraesporal de la subespecie *israelensis* y *morrisoni* (PG-14) son muy similares, se ha observado que difieren significativamente. La cepa PG-14 contiene una proteína principal de 144 KDa que no se presenta en el cuerpo paraesporal de la subespecie *israelensis* (Ohuba M et al, 1989). Estudios para precisar la toxicidad de la proteína de 144 KDa, fue determinado mediante la producción de dos mutantes a partir de la cepas PG-14. La cepa M 146 que presentó la proteína de 65 KDa resulto menos tóxica que la cepa nativa y la cepa M 242 con un cristal de forma bipiramidal compuesto de una proteína de 144 KDa, la cual carece de toxicidad

a mosquitos (*A. aegypti*) sin embargo presento considerable actividad (LC_{50} de 2.5 $\mu\text{g/ml}$) para lepidopteros como por ejemplo *Trichoplusia ni* (Padua and Federici, 1990).

También se ha observado que en las subespecie *israelensis* y *morrisoni* presentan sinergismo entre las proteínas de 25 y 65 KDa. En un ensayo donde se utilizó la cepa 1884 de la subespecie *israelensis* y PG-14 subespecie *morrisoni* se colocó sólo la proteína de 28 KDa sin la proteína de 68 o 138 KDa, presentó ausencia en la actividad larvicida a mosquitos, sin embargo, exhibió toxicidad cuando las dos proteínas la de 28 y 65 KDa se colocaron juntas (Thiery, 1987). Igualmente utilizando las dos proteínas purificadas de la cepa PG-14 la de 25 y 65 KDa presentaron un efecto sinérgico cuando se aplicaban en diferentes concentraciones sobre la actividad larvicida a mosquitos, pero sin mostrar actividad hemolítica. Efecto similar para la proteína P1 en la actividad mosquitocida, también se ha reportado para las cepas de la subespecie *israelensis* (Yu, 1987).

Proteínas de la inclusión paraesporal (P1) de la cepa PG-14 subespecie *morrisoni* (serotipo H-8a8b) y cepas de la subespecie *israelensis* (serotipo H-14) fueron comparados usando electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio " SDS-PAGE ". La fracción P1 de la cepa PG-14 contiene dos proteínas principales con peso molecular de aproximadamente 28 y 68 KDa, mientras que P1 de la subespecie *israelensis* presenta tres proteínas de 28, 38 y 68 KDa. Las dos proteínas tóxicas de P1 de la cepa PG-14 fueron purificadas a través del método de filtración en gel con Sephadex G-200 y cromatografía en columna de celulosa-DEAE. El peso molecular de la proteína con actividad mosquitocida y hemolítica se determinó para las proteínas de 65 y 25 KDa, respectivamente. Los valores de la LC_{50} de la actividad mosquitocida para las proteínas de 65 y 25 KDa contra larvas de 2 a 3 días de edad de *Aedes aegypti* fue de 68.0 ng/ml y 3164.5 ng/ml respectivamente. Las concentraciones más bajas de la proteínas de 65 y 25 KDa mostraron actividad hemolítica contra células sanguíneas rojas de borrego en

una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ y 32 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Yu et al, 1987).

En una investigación donde se utilizó cromatografía de afinidad mediada por anticuerpos para la separación de la fracción que contiene la proteína de 65 KDa sin la proteína de 25 KDa de la cepa PG-14 para observar la actividad larvicida a mosquitos de *Aedes aegypti* y la actividad hemolítica en glóbulos rojos de borrego, los valores de LC_{50} de las proteínas de 65 y 25 KDa fue de 0.69 $\mu\text{g/ml}$ y 83.9 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que para la actividad lítica del 100 porciento es de 1250 $\mu\text{g/ml}$ y 19.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Yu et al, 1988). Estudios posteriores encuentran que la concentración mínima requerida de la proteína de 25 KDa para obtener el 100 porciento de hemólisis se encuentran en el rango de 2-16 $\mu\text{g/ml}$ (Yu et al, 1989).

ACTIVIDAD DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* SEROTIPO H-8 CONTRA INSECTOS COLEOPTEROS

Más recientemente se han aislado nuevas cepas de *B. thuringiensis*, las cuales se han clasificado como subespecie *tenebrionis*, *san diego* y EG-2158 (aunque no son serotipos diferentes) todas las anteriores cepas presentaron una proteína tóxica específica hacia insectos Coleópteros (Ignoffo et.al., 1982). Se ha reportado que el cristal proteico de la subespecie *tenebrionis* presenta dos proteínas de aproximadamente 68 y 50 KDa (Li et.al, 1988), mientras que el cristal de la variedad *san diego* está compuesto de una proteína de 64 KDa y la cepa EG-2158 sintetiza dos cristales paresporales un cristal romboide compuesto de una proteína de 73.116 KDa y uno plano en forma de diamante de 30 KDa. En contraste las cepas que son activas contra insectos lepidópteros, tal como *B. thuringiensis* subespecie *kurstaki*, contiene típicamente proteínas de alto peso molecular de 130 a 140 KDa (MacPherson, 1988; Donovan, 1988; Herrnstadt et.al, 1986; Herrnstadt et.al., 1987). Actualmente dos nuevas cepas tóxicas a larvas de Coleópteros se han aislado, las cepas EG-2838 y EG-4961 pertenecen al serotipo H-9 (*B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*) y

serotipo H-18 (*B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*) respectivamente. En donde la cepa original de la subespecie *tolworthi* serotipo H-9 (HD-13) y *kumamotoensis* serotipo H-18 (HD-867) producen cristales proteicos tipo Cry-I, tóxicos a insectos Lepidópteros (Rupak M.J., 1991).

Estudios con la cepa de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* han demostrado que estadios larvales jóvenes del escarabajo colorado de la papa *Leptinotarsa decemlineata* son más susceptibles que los estadios larvales tardíos. La ingestión de la toxina causó la detención de la alimentación, parálisis del intestino y finalmente la muerte. Además, otras cepas del mismo serotipo (H-8a8b), tal como *B. thuringiensis* var. *morrisoni* se presentaron sin actividad a *L. decemlineata*. Pruebas de campo demostraron que una dosis de 5×10^4 esporas equivalentes por hectáreas es suficiente para un control efectivo *Leptinotarsa decemlineata* (Krieg et al, 1983).

Bioensayos para determinar la actividad de cepas de la subespecie *tenebrionis* han mostrado valores de LC_{50} en el rango de 5×10^6 - 11×10^6 esporas/ml de suspensión. Una comparación del estandar y la misma preparación después de la inactivación de la espóra por radiación gama, se manifestaron sin diferencia significativa en la mortalidad por lo que la eficacia del complejo espóra-cristal a larvas de primer estadio *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo colorado de la papa) parece depender solamente de la endotoxina (Riethmuller & Langenbruch, 1989).

Aplicaciones de un formulado comercial a base de *B. thuringiensis* var. *san diego* " M-one " resultó en un 40-98 % de mortalidad en larvas de segundo instar de *Leptinotarsa decemlineata*, 96 horas después de que comenzara a alimentarse del follaje de papa tratada y un 52 % de mortalidad en larvas de tercer estadio durante el mismo período de tiempo (Zehnder and Gelernter, 1989). De igual forma, se encontró un control efectivo de la población larval del escarabajo colorado de la papa, también

B. thuringiensis (GM), propagadas en tres medios de cultivos a base de agua de coco y harina de soya suplementado con líquido de remojo de maíz, extracto de levadura y extracto de malta, para determinar la influencia del medio sobre la toxicidad, las cepas pertenecientes al serotipo H-8, GM-2 y GM-5, presentaron porcentajes de mortalidad de 35 % y 29.3 respectivamente con una concentración de 500 µg/ml de dieta contra larvas neonatas de *S. frugiperda* (Hernandez J.L., 1984). En otro trabajo donde se determinó la actividad a trece cepas de GM, en donde GM-20, GM-24, GM-26, GM-27 y GM-29 pertenecen al serotipo H-8, todas las cepas se propagaron en medio a base de melazas, la actividad en % de mortalidad de las cepas fueron para la GM-20 de 0 y 4 %; GM-24 de 4 y 12 %; GM-26 de 0 y 4 %; GM-27 de 10 y 28 %; y GM-29 de 4 y 8 % con concentración de 50 y 500 µg/ml contra *S. frugiperda*, mientras que la mortalidad en *H. virescens* con la cepa GM-20 de 32 y 24 %; GM-24 de 44 y 16 %; GM-26 de 28 y 24 %; GM-27 de 40 y 20 % y GM-29 36 y 24 % (Castro P.A., 1985). De igual forma, (Castro A.J., 1982) reporta para la cepa GM-2 propagada sobre dos medios diferentes, una mortalidad del 4 % en concentraciones de 50 y 500 µg/ml en medio con almidón, mientras que en el medio B-4b no presentó toxicidad contra larvas de *S. frugiperda*.

Gómez en 1989 caracterizó la delta endotoxina de la cepa de *B. thuringiensis* GM-2, también efectuó una comparación con la cepa de *B. thuringiensis* serotipo H-8a8b con la cual cruza serológicamente, sin embargo, de acuerdo a las pruebas bioquímicas no corresponde a ninguna de las variedades previamente descritas. Por el método de solubilización y separación de cromatografía en columna, encontró que los cristales de GM-2 presentan una proteína con un peso molecular de 47 KDa y bajo un método de solubilización más drástico el cristal se degrada en dos proteínas, una de 30 KDa y otra más pequeña (20 ± 5 KDa), mientras que la cepa de la subespecie *morrisoni* mostró una proteína de 135 KDa. Los bioensayos contra larvas de *Aedes aegypti* y *Trichoplusia ni* con la GM-2 no presentaron mortalidad, mientras que la subespecie *morrisoni* se manifestó con actividad tóxica a larvas de *T. ni*.

Igualmente Galán W. 1990, reporta que la cepa GM-2 presenta características similares a antígenos flagelares y las mayoría de las pruebas bioquímicas para la subespecie *morrisoni*. La inclusión paraesporal producido por la GM-2 es de forma rectangular y es diferente a la forma bipiramidal de la subespecie *morrisoni*. Aunque se han presentado reportes que esta variedad es activa contra varias especies de insectos, incluyendo *T. ni*, mientras que pruebas con GM-2 contra larvas de *T. ni*, *H. virescens* y *A. aegypti* no presentaron actividad insecticida significativa.

Finalmente de Barjac hace referencia sobre las dificultades de clasificación dentro del serotipo H-8. La identificación de *B. thuringiensis* var. *israelensis* como una serovariedad diferente no presentan ninguna dificultad debido a que el antígeno H-14 es específico. Sin embargo, la variedades denominados "tenebrionis" y "san diego" comparten el mismo antígeno H como variedad *morrisoni* (H-8a8b) diferenciando solamente en su patogenicidad a larvas de Coleópteros. Aunque la patogenicidad no es un criterio confiable en taxonomía, la distinción de cepas de *B. thuringiensis* con distinta patogenicidad es útil por razones prácticas. Además, interpretaciones como patovariedad o biovariedad (basados en características de pruebas bioquímicas como ADH, manosa, celobiosa, salicina, quitina) permanecen sin aumentar y/o cambiar el estatus de serovariedad por lo que permanece como *morrisoni*. Los estudios realizados muestran que el aislado "san diego" es similar a "tenebrionis", por lo que tiene poco valor el ser justificados como una variedad diferente. Esto se manifiesta de la misma forma con el aislado PG-14, en base a la patogenicidad a larvas de mosquitos y mosca negra y reacciones bioquímicas específicas (esculina, salicina, quitina). Sin embargo, la designación de tales variedades carece de valor taxonómico y cualquier utilidad debe ser restringido a casos especiales, tal como la patogenicidad a Coleópteros en el caso de "tenebrionis". De otro modo las variedades de *B. thuringiensis* podrían estar basados sobre criterios dudosos (de Barjac H. and E. Frachon, 1990).

Por todo lo mencionado, se observa que existen muy pocos trabajos sobre la toxicidad hacia larvas de Lepidópteros, además de que hay escasas investigaciones acerca de cepas de *B. thuringiensis* que pertenecen al serotipo H-8a8c y H-8a8d, subespecie *ostriniae* y *nigeriensis* con respecto al tipo de insecto que son tóxicos, por lo que la importancia de la presente investigación radica en determinar el rango de huesped que presentan cepas autóctonas del serotipo H-8 y realizar comparación con cepas de colección con respecto a su actividad tóxica para Lepidópteros plaga de importancia agrícola.

MATERIAL Y METODO

1.- Obtención de las cepas.

Las cepas fueron proporcionadas por la Colección Internacional de cepas y extractos de *B. thuringiensis* del Depto. de Microbiología e Inmunología denominadas GM (42). Se seleccionaron aquellas que estuvieron clasificadas dentro del serotipo H-8, de las cuales se obtuvieron 11 cepas; 9 pertenecientes al serotipo H-8a8c de la subespecie *ostriniae* y solamente 2 al serotipo H-8a8d de la subespecie *nigeriensis*. La mayoría de las cepas presentaron forma de cristal cuadrado, rectangular y ovalado irregular (TABLA 1). Por otra parte, se escogieron de la colección HD proporcionadas por el Dr Howard T. Dulmage investigador del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Weslaco, Texas, solamente aquellas cepas que pertenecían al serotipo H-8, de las cuales se seleccionaron 6 cepas del serotipo H-8a8b de la subespecie *morrisoni*, 3 cepas al serotipo H-8a8d subespecie *ostriniae* y 1 cepa al serotipo H-8a8c subespecie *nigeriensis* (TABLA 2).

2.- Propagación de las cepas.

Las cepas de *B. thuringiensis* autóctonas de México se activaron en tubos de ensaye de 18 X 150 con Agar Nutritivo e incubandose por 24 horas a 32 °C. Posteriormente de cada cepa se tomaron dos azadas del cultivo para inocular matraces de 250 ml con 50 ml de Caldo Triptosa Fosfato (C.T.P); Bactotripton 20 g, Dextrosa 2 g, Na Cl 5 g, KH_2PO_4 2.5 g, Agua Destilada 1000 ml, pH 7.0. Los matraces se colocaron en agitación mecánica a 200 rpm a 32 °C por 14 a 18 horas utilizando un Lab-Line Orbit Incubator Shaker 3595. Posteriormente se tomaron 0.5 ml de los matraces en agitación para inocular matraces de 500 ml con 100 ml de Medio de Fermentación (Melaza 20 g, Harina de Soya 20 g, Líquido de Remojo de Maíz 10 g y/o Extracto de Levadura 1 g, Carbonato de Calcio 1 g, pH 7.0) y colocados en agitación a 200 rpm a 32 °C por 48 a 72 horas. Los cultivos se cosecharon hasta la formación del 90 por ciento de esporas y cristales, observación realizada al microscopio de luz (Dulmage, 1989).

3.- Recuperación del cuerpo paraesporal (cristal).

La extarcción del complejo espóra-cristal del medio de fermentación se realizó mediante la técnica de Dulmage 1970. El método se basa en centrifugar el medio de fermentación (previamente ajustado el pH de 8.5 a 7.0 con NaOH al 1 N) a 10,000 rpm por 30 minutos. Después de este período se retira de inmediato el sobrenadante y el paquete celular se coloca en un volumen de Lactosa al 5 % (peso del paquete X 1.71) y se agitó por 30 minutos. Posteriormente se agrega un volumen de Acetona (volumen de lactosa X 3.34 peso del paquete) y se dejó el mismo tiempo en agitación y después permanece en reposo por un período de 10 minutos y se filtra toda la muestra al vacío utilizando papel Whatman No 1. El papel se conserva toda la noche y posteriormente se desprende el producto, el cual se muele en un mortero y el polvo se deposita en contenedores y se almacena hasta la realización de los bioensayos.

4.- Bioensayos con insectos Lepidópteros.

Para cada uno de los extracto se pesaron 125 mg y se suspendieron en agua destilada, utilizando un matraz de aforación de 25 ml. A partir del concentrado se tomaron 12.5 ml y 1.25 ml, este último se diluyó en 11.25 ml de agua destilada. Estas dos concentraciones se mezclaron por separado en licuadora con 112.5 ml de dieta para larvas de insectos (Tabla 3) para obtener la concentración final de 500 µg/ml y 50 µg/ml. De cada concentración (125 ml de volumen total) se llenaron 25 copas con aproximadamente 5 ml en cada una. Posteriormente se dejaron secar por un lapso de 2 horas a temperatura ambiente. En cada bioensayo se corrió un estándar de referencia a base de *B. thuringiensis* subespecie *kurstaki* (HD-1-S-1980) con concentraciones de 50 µg/ml y 25 µg/ml.

Individualmente se infestaron las copas con una larva neonata del primer estadio de los tres insectos Lepidópteros a probar, respectivamente. Se utilizaron larvas de *Trichoplusia ni* (falso medidor), *Heliothis virescens* (gusano cogollero) *Spodoptera exigua* (gusano soldado), colocándose una larva por cada copa. Las 25 copas de cada concentración se depositaron en bolsas de papel y se

almacenaron por un período de 7 días en bolsa de plástico a temperatura de 28 °C y humedad relativa constante. Después del tiempo de incubación se evaluó el número de larvas muertas y vivas (Dulmage et.al., 1976). Las muestra que presentaron más del 50 % de mortalidad en la concentración de 50 µg/ml se sometieron a posteriores bioensayos, en donde se utilizó 7 concentraciones más bajas para determinar finalmente la Dosis Letal Media (DL₅₀) de la muestra, se usó el método estadístico PROBIT (Finley D.J., 1971).

5.- Determinación de la potencia.

Para la determinación de la potencia, se seleccionaron aquellas cepas de *B. thuringiensis* que resultaron con mortalidad superior al 50 por ciento, en el ensayo preliminar donde se utilizó dos concentraciones (500 y 50 µg/ml). En esta prueba se seleccionó solamente dos cepas HD (HD-116 y HD-530) con buena actividad contra larvas de *T. ni*, mientras que dentro de las cepas GM únicamente se eligió a la cepa GM-55, la cual resultó de las mejores cepas contra larvas de *S. exigua*. Para determinar la DL₅₀ de las cepas se realizaron siete concentraciones a partir del stock (el cual contiene una concentración de 500 µg/ml) se realizaron diluciones seriadas con una concentración final de 500, 400, 300, 200, 100, 50 y 25 µg/ml de dieta. Se utilizó un volumen de 12,5 ml de cada concentración, mezclándolo con un volumen de 112.5 de dieta para insectos. Posteriormente se sigue el mismo procedimiento de bioensayo mencionado anteriormente. El número de insectos muertos que resultó después de siete días de incubación se someten a un programa estadístico probit. El valor de DL₅₀ del estándar se divide con la DL₅₀ de la muestra obtenidas del análisis probit y se multiplica por 18000. La potencia de las cepas se reportó en Unidades Internacionales/mg de muestra (Dulmage H.T., 1970).

RESULTADOS

Los bioensayos realizados con los extractos obtenidos a partir de las cepas GMs de *Bacillus thuringiensis* contra larvas de *Trichoplusia ni* presentaron mortalidad inferior al 50 por ciento. La cepa con mayor actividad fué la cepa GM-55, la cual presentó 42 y 16 % de mortalidad con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ de dieta respectivamente y la cepa GM-5 con 24.3 % de mortalidad con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ y 10 % de mortalidad con dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ de dieta, mientras que las cepas restantes manifestaron mortalidad menor al 20 % con ambas concentraciones (Fig. 1). Las mismas cepas pero evaluadas contra larvas de *Heliothis virescens*, presentaron una toxicidad igual y/o menor al 50 % de mortalidad. La cepa con mayor actividad fue la cepa GM-20 con un 18 por ciento de mortalidad con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ y 4 % con 50 $\mu\text{g/ml}$ de dieta para las cepas restantes se encontró una actividad inferior al 18 % de mortalidad (Fig. 2). Contra larvas de *Spodoptera exigua* la cepa con mayor actividad fue la cepa GM-55, la cual presentó una mayor mortalidad de hasta 50.58 % con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ y 48.58 % en la dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ de dieta, mientras que las cepas faltantes se manifestaron con mortalidad inferior al 24.25 por ciento de mortalidad (Fig. 3).

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante bioensayo de los extractos de fermentación almacenados de las cepas HD de *B. thuringiensis* fueron realizados de la misma forma que las cepas GM. De seis cepas HD evaluadas del serotipo H-8a8b variedad *morrisoni*, dos cepas presentaron actividad alta contra larvas de *T. ni*, las cuales fueron la cepa HD-530 con 100 % de mortalidad con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ y 38.66 % de mortalidad con 50 $\mu\text{g/ml}$ de dieta y la cepa HD-116 mostró toxicidad de 100 % y 15 % de mortalidad con concentraciones de 500 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de dieta respectivamente. Las cepas restantes de HD (531, 557, 615 y 652) presentaron toxicidad inferior al 16 % de mortalidad con una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ de dieta (Fig. 4). Mientras que, cepas HD pertenecientes al serotipo H-8a8c variedad *ostrinae* (501, 536 y 577) presentaron actividad tóxica inferior al 10 % de mortalidad y la cepa HD-974

variedad *nigeriensis* mostró 12 por ciento de mortalidad con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ de dieta contra larvas neonatas de *T. ni* (Fig. 7). De la misma forma, las cepas HD de *B. thuringiensis* se evaluaron contra larvas de *H. virescens* y *S. exigua* y mostraron actividad tóxica menor a la exhibida contra larvas de *T. ni*. Las cepas con mayor actividad fué HD-530 con 24 % y 72 % de mortalidad contra *H. virescens* y *S. exigua* respectivamente y la cepa HD-116 con 27.39 % de mortalidad contra larvas de *H. virescens* y 55.81 % de mortalidad contra larvas de *S. exigua* con concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ de dieta para ambas cepas. Todas las cepas restantes del mismo serotipo presentaron una toxicidad inferior al 16 % de mortalidad (Fig. 5 y 6). Mientras que cepas de la variedad *ostriniae* y *nigeriensis* mostró una actividad tóxica menor al 12 % de mortalidad con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ de dieta contra larvas de *H. virescens* y *S. exigua* (Fig. 8 y 9).

Por otro lado, de los extractos almacenados se recuperaron las cepas, las cuales se sometieron a un nuevo proceso de fermentación y producción del complejo spora-cristal. De las dos cepas que fueron tóxicas contra larvas de *T. ni* con los extractos almacenados, solamente la cepa HD-116 presentó un ligero decremento en el porcentaje de mortalidad en la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ de dieta bajando de 100 % a 72 %. Para las cepas restantes del mismo serotipo (H-8a8b) se comportaron con porcentajes de mortalidad muy similares a los encontrados con las cepas de extractos almacenados contra el mismo insecto (Fig. 4 y 10). Con lo que respecta a los extractos de fermentación recientes de las cepas del serotipo H-8a8c (HD-501, HD-536 y HD-577) y H-8a8d (HD-974), presentaron porcentaje de mortalidad ligeramente superior en las cepas HD-501 y HD-536, mientras que las cepas HD-577 y HD-974 se encontró porcentajes de mortalidad muy semejantes con las cepas de extractos almacenados contra larvas de *T. ni* (Fig. 7 y 13). De igual forma las mismas cepas se evaluaron contra larvas de *H. virescens*, con este insecto la cepa HD-530 presentó un incremento de 42 por ciento en la mortalidad en el extracto de fermentación reciente con respecto a las cepas de extractos almacenados en la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ de

dieta, mientras que para las cepas restantes del mismo serotipo (H-8a8b) se encontraron porcentajes muy similares (Fig. 5 y 11). Las cepas restantes de fermentación reciente presentaron porcentajes de mortalidad ligeramente superior o parecidos, correspondiendo para las cepas HD-501 y HD-577 del serotipo H-8a8c un incremento de 12 y 13 % de mortalidad respectivamente contra el mismo insecto (Fig 8 y 14). La evaluación con larvas de *S. exigua* con cepas de extractos de fermentación reciente, la mayoría de las cepas presentó incremento en el porcentaje de mortalidad desde 27.16 en la cepa HD-559 a 6 % en la cepa HD-974, incluyendo cepas de los serotipos H-8a8b, H-8a8c y H-8a8d, mientras que dos cepas HD-116 y HD-530 mostraron decrementos en el porcentaje de mortalidad, con 17.72 y 8 en la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (fig. 6, 9, 12 y 15).

La potencia encontrada por el método estadístico PROBIT de las cepas de *B. thuringiensis* que resultaron tóxicas en el ensayo preliminar fue de 4727 Unidades Internacionales (U.I.), para la cepa HD-116 de extractos almacenados y de 1018 U.I. para la cepa HD-116 de extractos recientes, mientras que para la cepa HD-530 de extractos almacenados presentó una potencia de 7272.51 y para extractos recientes se obtuvo una potencia de 2565 U.I (Tabla 5).

Tabla 1.- Forma del cristal y serotipo a que pertenecen las cepas clave GM autóctonas de *Bacillus thuringiensis*.

CLAVE	SEROTIPO	SUBESPECIE	FORMA DEL CRISTAL
GM-2	8a 8b	morrisoni	rectangular
GM-5	8a 8c	ostriniae	rectangular
GM-13	8a 8c	ostriniae	rectangular
GM-20	8a 8c	ostriniae	cuadrado-rectangular
GM-24	8a 8c	ostriniae	cuadrado
GM-26	8a 8c	ostriniae	rectangular
GM-27	8a 8c	ostriniae	rectangular
GM-29	8a 8c	ostriniae	rectangular
GM-51	8a 8d	nigeriensis	ovalado-irregular
GM-52	8a 8c	ostriniae	rectangular
GM-55	8a 8d	nigeriensis	ovalado-irregular

Colección internacional de bacilos entomopatógenos: catálogo de *Bacillus thuringiensis* aislados y extractos. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L (38).

Tabla 2.- Cepas de *Bacillus thuringiensis* de la Colección Internacional HD seleccionadas y su forma de cristal

CLAVE	SEROTIPO	SUBESPECIE	FORMA DEL CRISTAL
HD-116	8a 8b	morrisoni	*bipiramidal
HD-530	8a 8b	morrisoni	bipiramidal
HD-531	8a 8b	morrisoni	rectangular
HD-559	8a 8b	morrisoni	rectangular
HD-615	8a 8b	morrisoni	bipiramidal
HD-652	8a 8b	morrisoni	ND
HD-501	8a 8c	ostrinae	rectangular
HD-536	8a 8c	ostrinae	rectangular
HD-557	8a 8c	ostrinae	rectangular
HD-974	8a 8d	nigeriensis	bipiramidal

Colección de extractos de fermentación de *B. thuringiensis* U.S.D.A (33).

ND = no determinado

* observación de los cristales al microscopio de luz de cepas recuperadas.

Tabla 3.- Dieta artificial "Shorei" modificada utilizada para la realización del bioensayo y mantenimiento de la cría de insectos

Harina de Soya	71.1 g
Germen de Trigo	31.7 g
Sal Wesson	10.6 g
Sacarosa	13.0 g
Ac. Sórbico	1.0 g
Metylparaben	1.6 g
Agar	15.7 g
Ac. Ascórbico	4.3 g
Ac Acético (29 %)	12.0 ml
Formalina (10 %)	4.4 ml
Cloruro de Colina (15 %)	7.3 ml
Solución Vitaminica	3.9 ml
Auromicina (14 %)	1.2 ml
Agua Destilada	1000 ml

Raulston and Lingren, 1972.

Tabla 4.- Clasificación de *Bacillus thuringiensis*.

Antígeno H	Serovariedad	Abreviación
1	thuringiensis	THU
2	finitimus	FIN
3a	alesti	ALE
3a3b	kurstaki	KUR
4a4b	sotto	SOT
4a4C	kenyae	KEN
5a5b	galleriae	GAL
5a5c	canadensis	CAN
6	entomocidus	ENT
7	aizawai	AIZ
8a8b	morrisoni	MOR
8a8c	ostrinae	OST
8a8d	nigeriensis	NIG
9	tolworthi	TOL
10	darnistadiensis	DAR
11a11b	toumanoffi	TOU
11a11c	kyushuensis	KYU
12	thompsoni	THO
13	pakistani	PAK
14	israelensis	ISR
15	dakota	DAK
16	indiana	IND
17	tohokuensis	TOH
18	kumamotoensis	KUM
19	tochigiensis	TOC
20	yunnanensis	YUN
20a20c	pondicheriensis	PON
21	colmeri	COL
22	shandongiensis	SHA
23	japonensis	JAP
24	neoleonensis	NEO
25	coreanensis	COR
26	silo	SIL
27	mexicanensis	MEX

de Barjac, 1990.

Fig. 1 Actividad de cepas nativas de *B. thuringiensis* clave GM pertenecientes al serotipo 8 contra larvas de *I. ni*

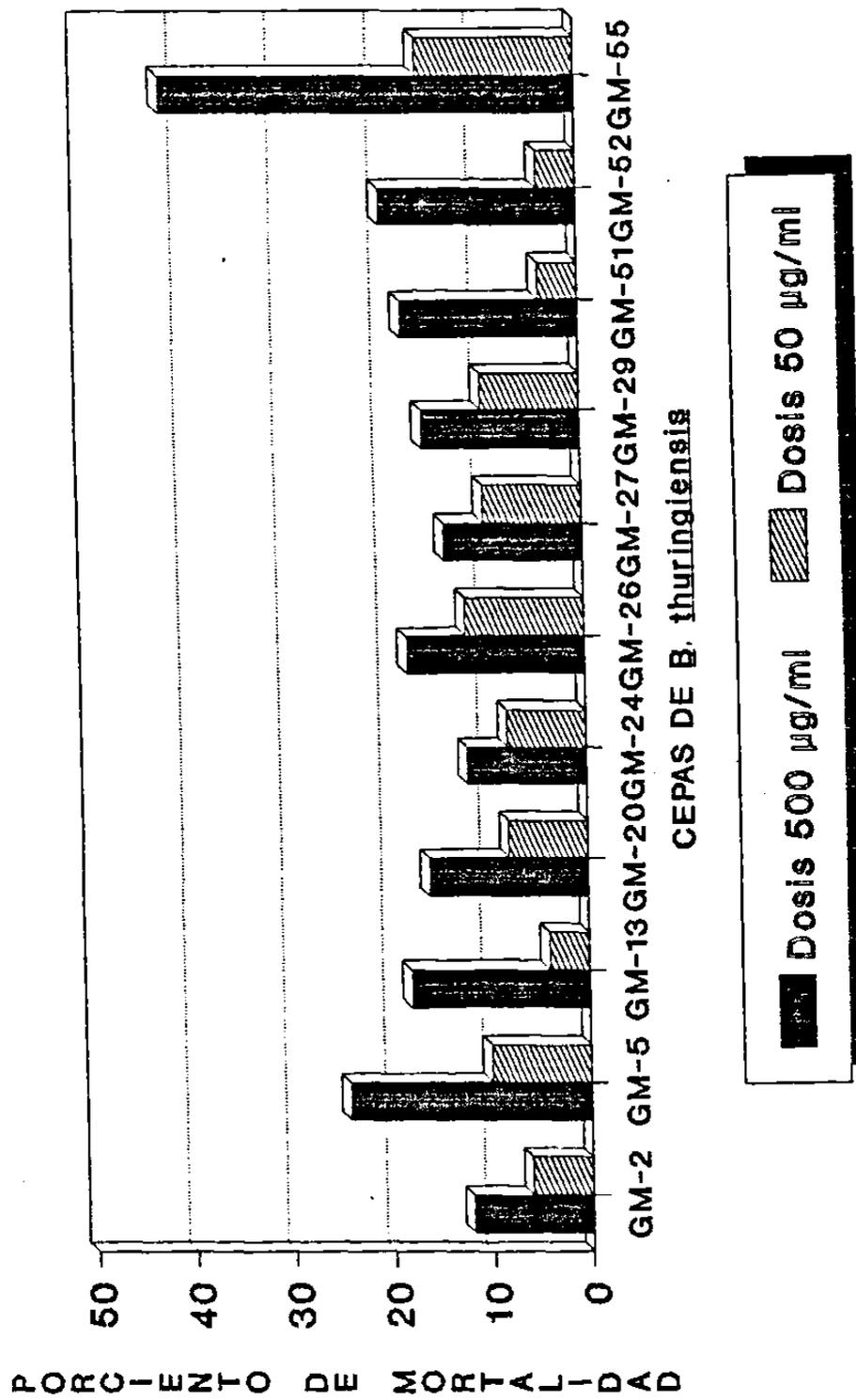


Fig. 2 Actividad de cepas nativas de *B. thuringiensis* clave GM pertenecientes al serotipo 8 contra *H. virescens*

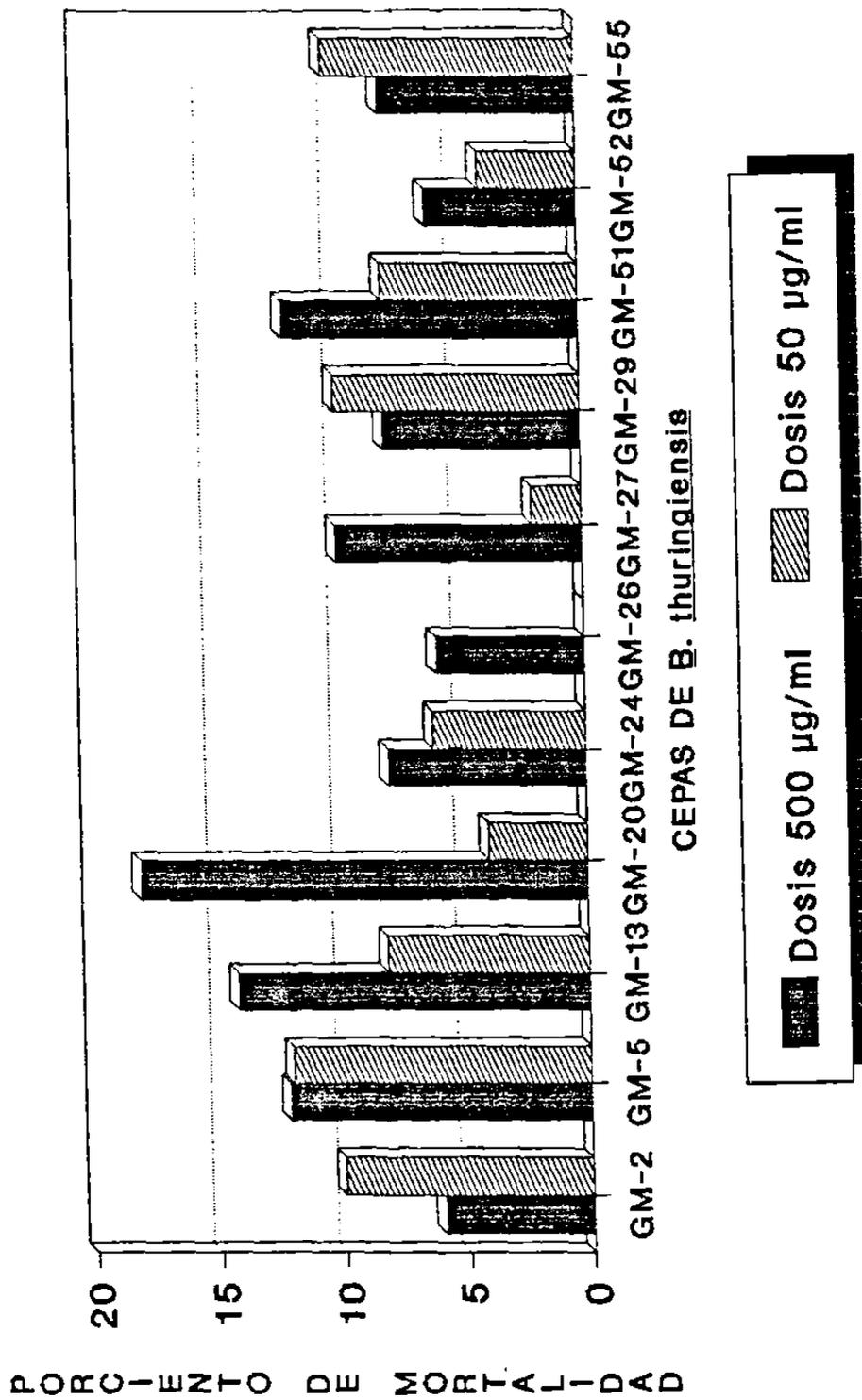


Fig. 3 Actividad de cepas nativas de *B. thuringiensis* clave GM pertenecientes serotipo 8 contra larvas de *S. exigua*

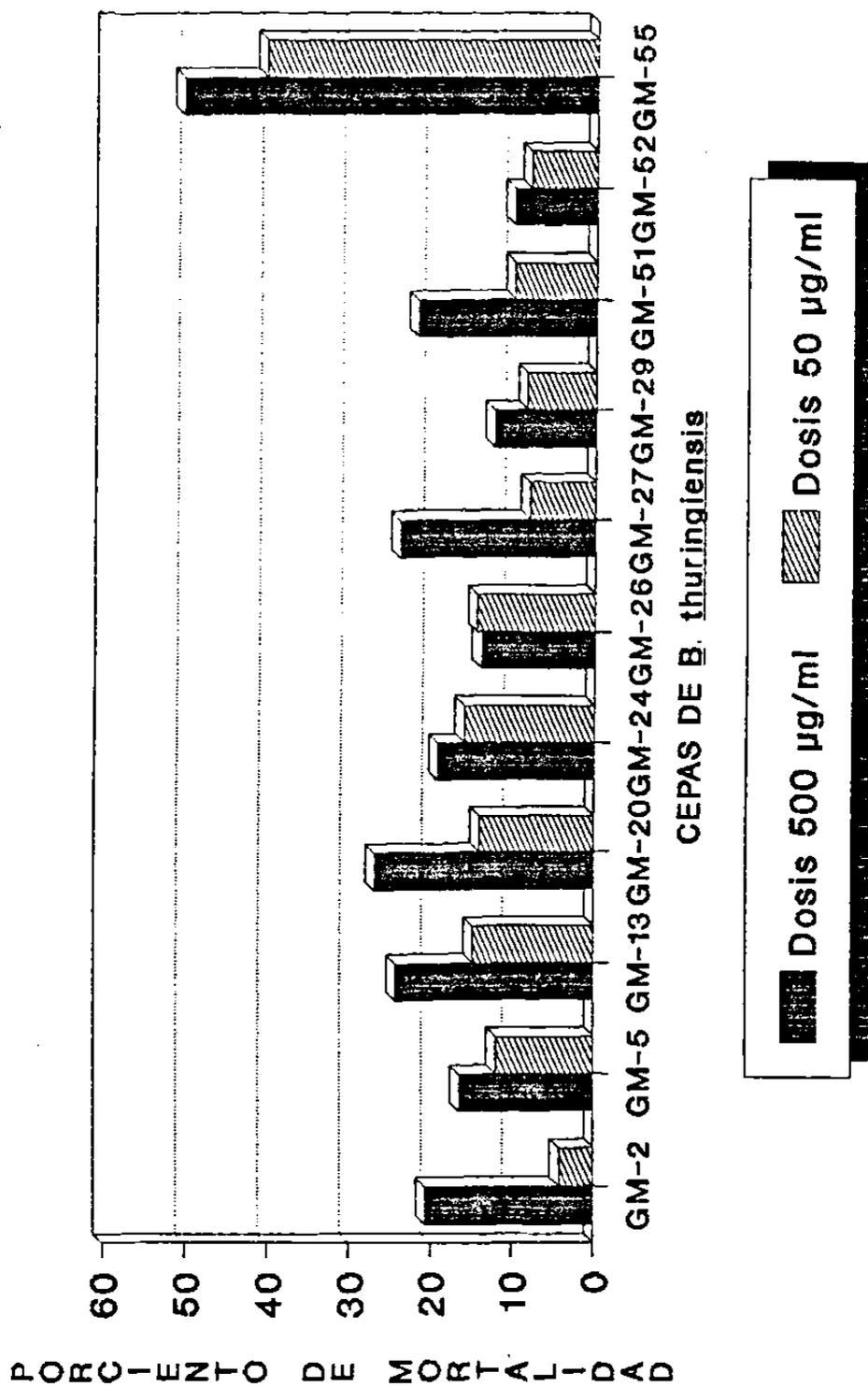


Fig.4 Actividad de extractos almacenados de cepas HD *B. thuringiensis* serotipo 8a8b contra larvas de *I. ni*

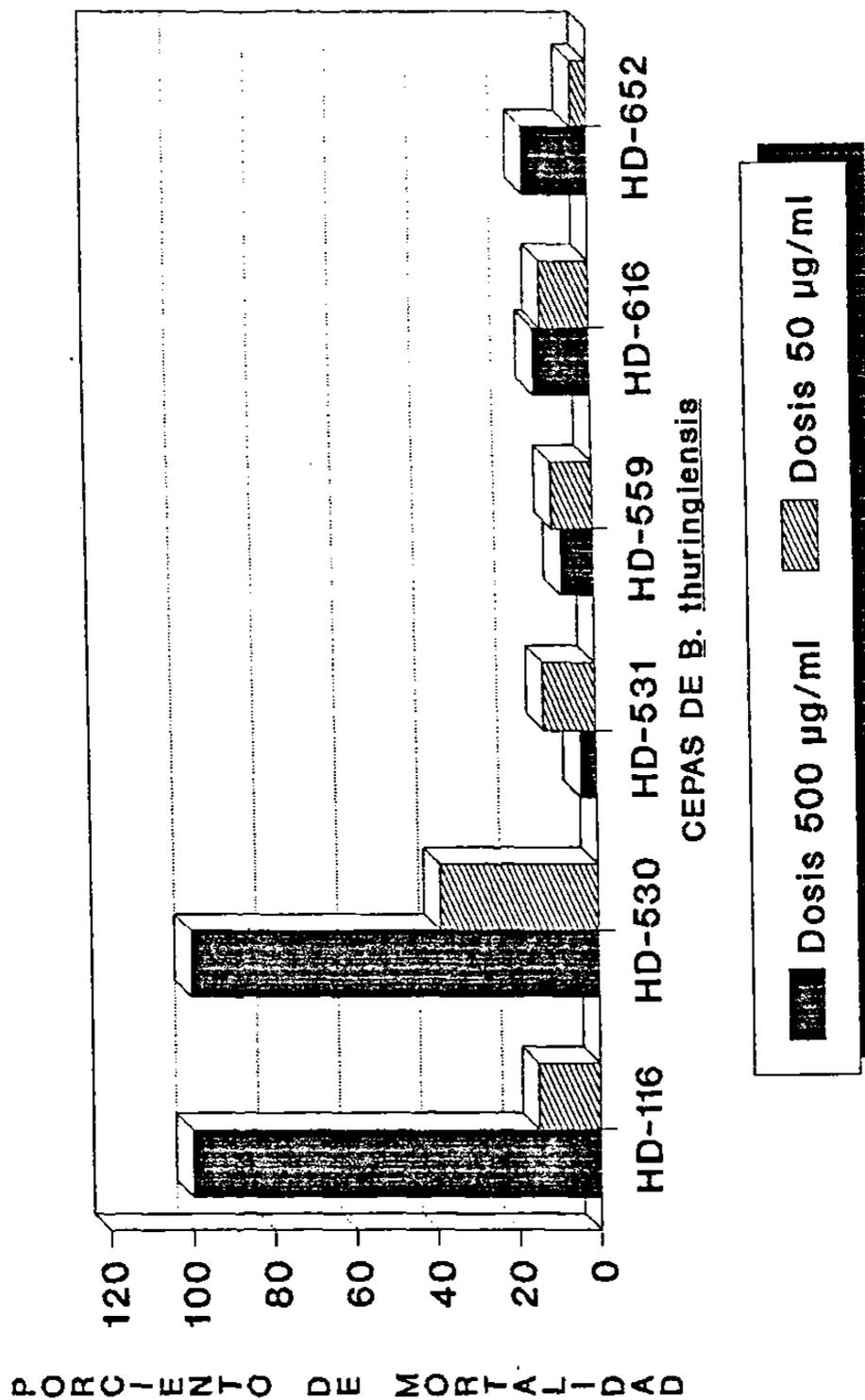


Fig.5 Actividad de extractos almacenados de cepas HD de *B. thuringiensis* serotipo 8a8b contra larvas de *H. virescens*

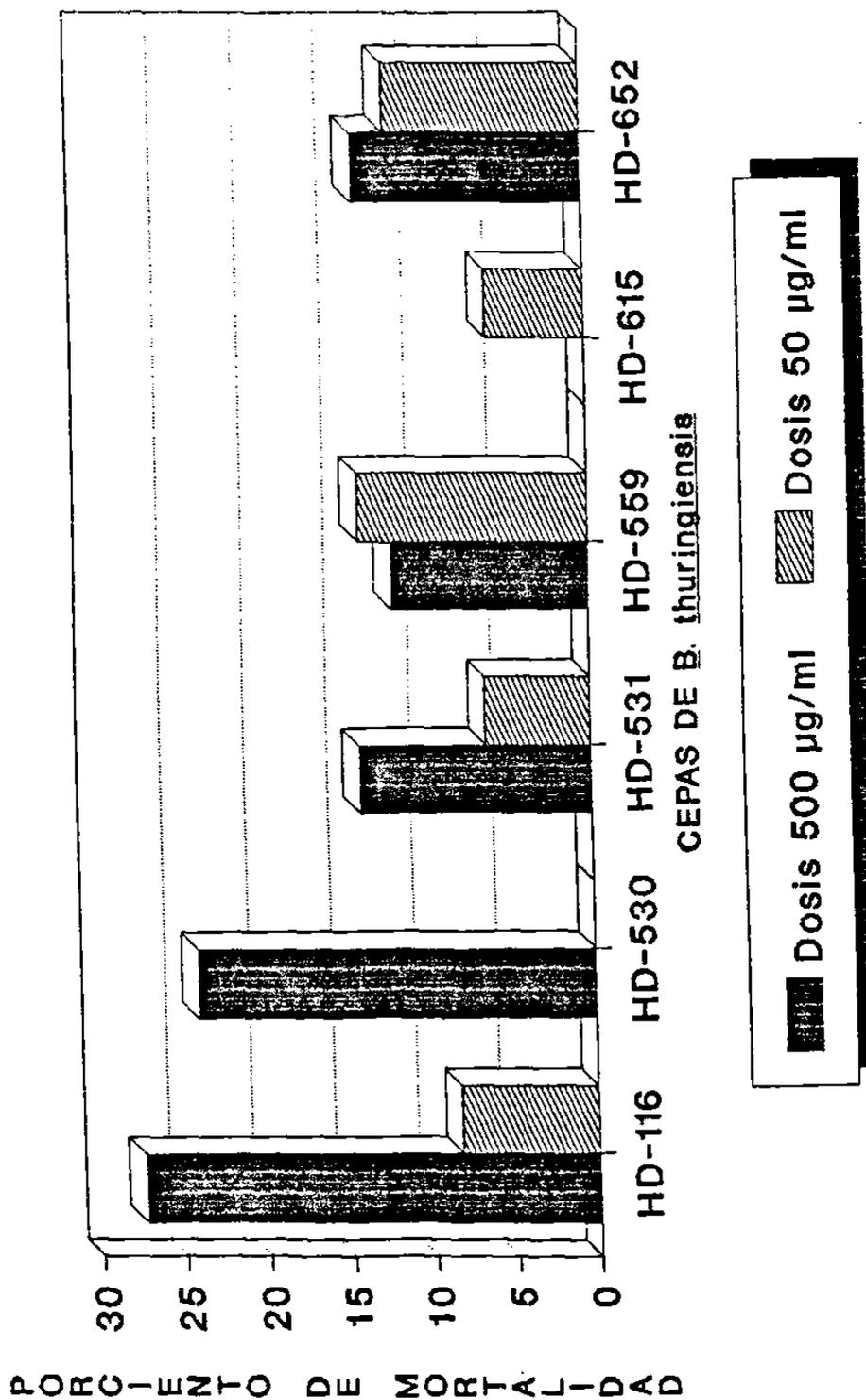


Fig.6 Actividad de extractos almacenados de cepas HD de *B. thuringiensis* serotipo 8a8b contra larvas de *S. exigua*

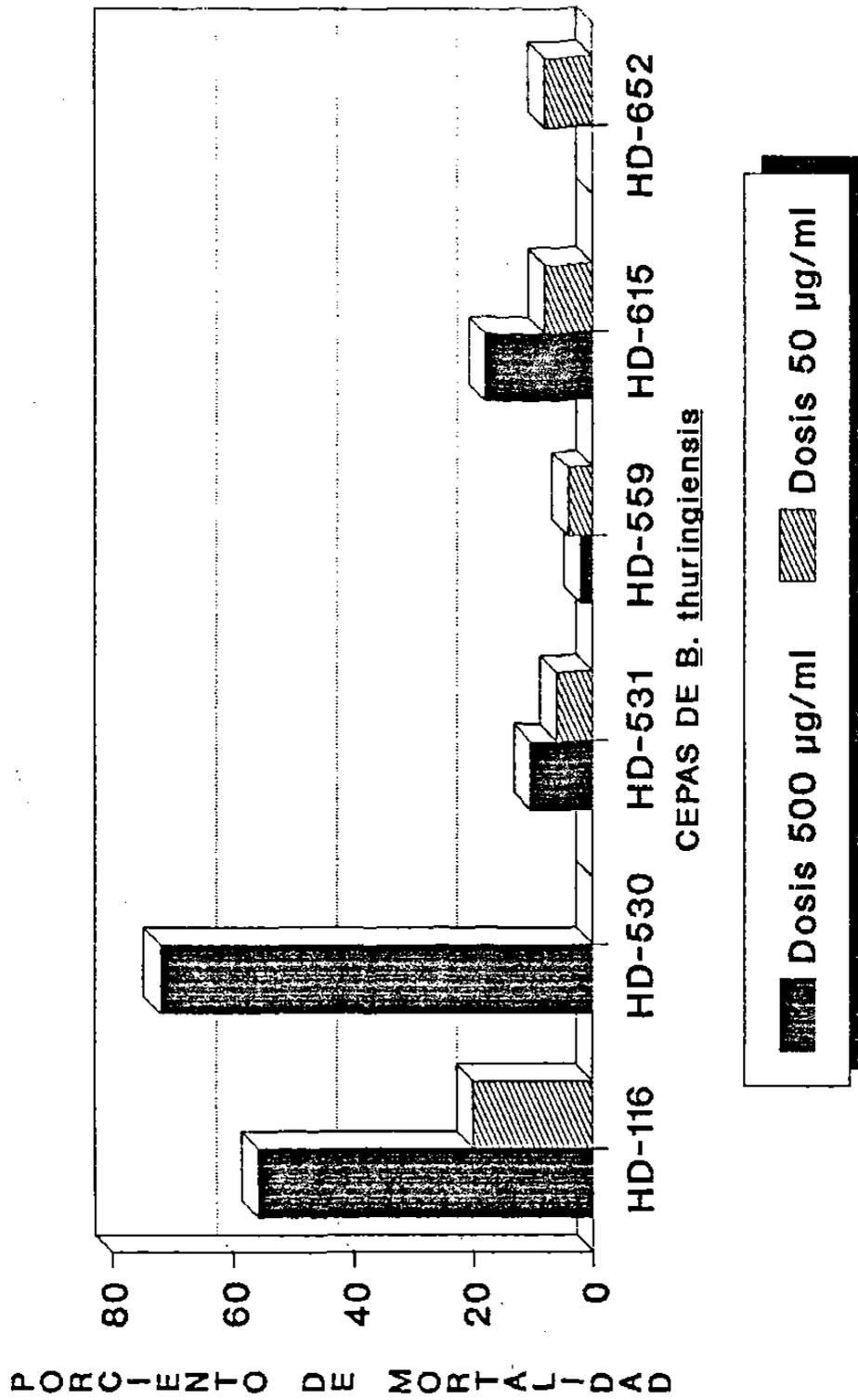


Fig.7 Actividad de extractos almacenados de cepas HD de *B. thuringiensis* serotipo 8 contra larvas de *I. ni*

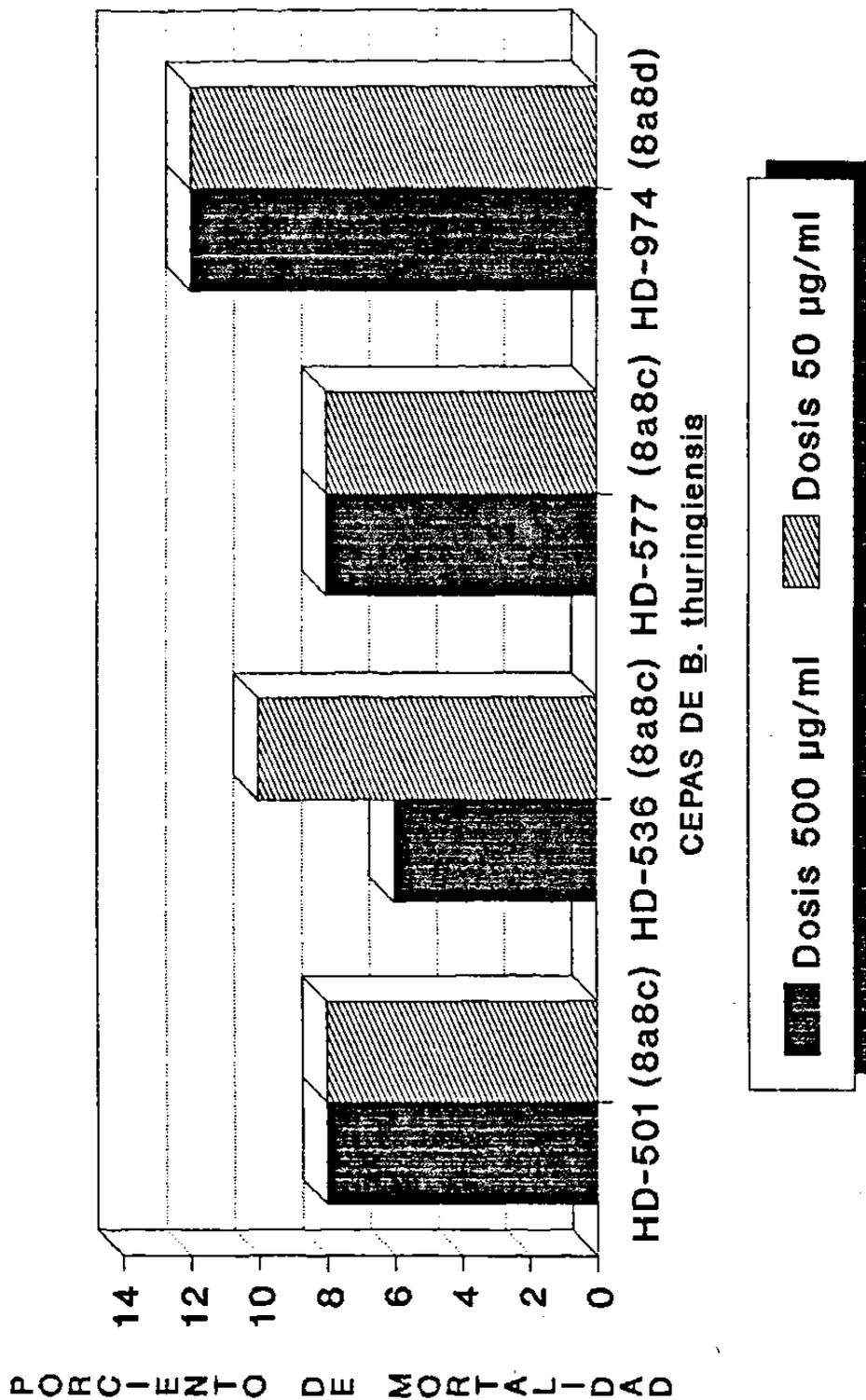


Fig.8 Actividad de extractos almacenados de cepas HD de *B. thuringiensis* serotipo 8 contra larvas de *H. virescens*

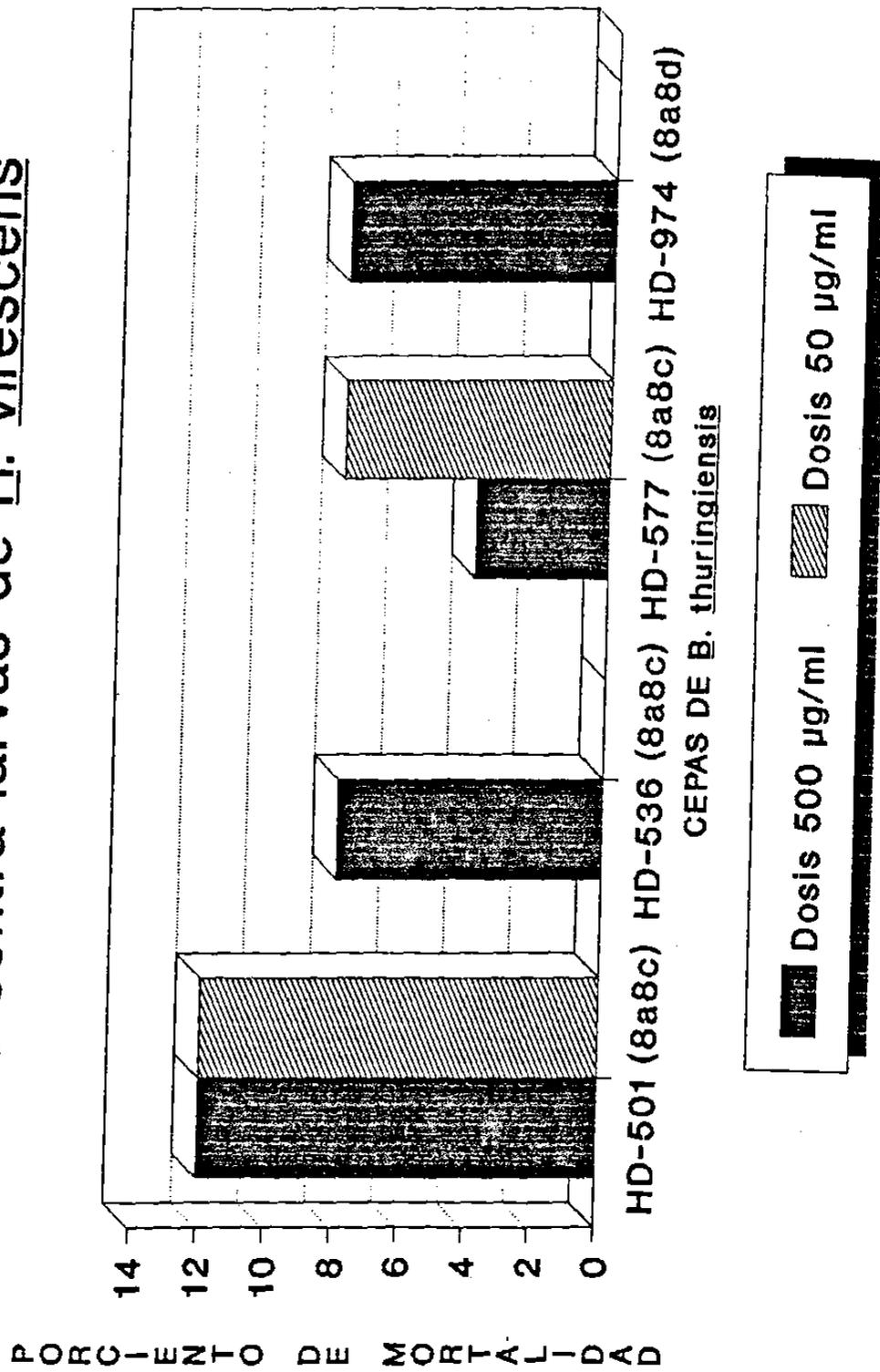


Fig.9 Actividad de extractos almacenados de cepas HD de *B. thuringiensis* serotipo 8 contra larvas de *S. exigua*

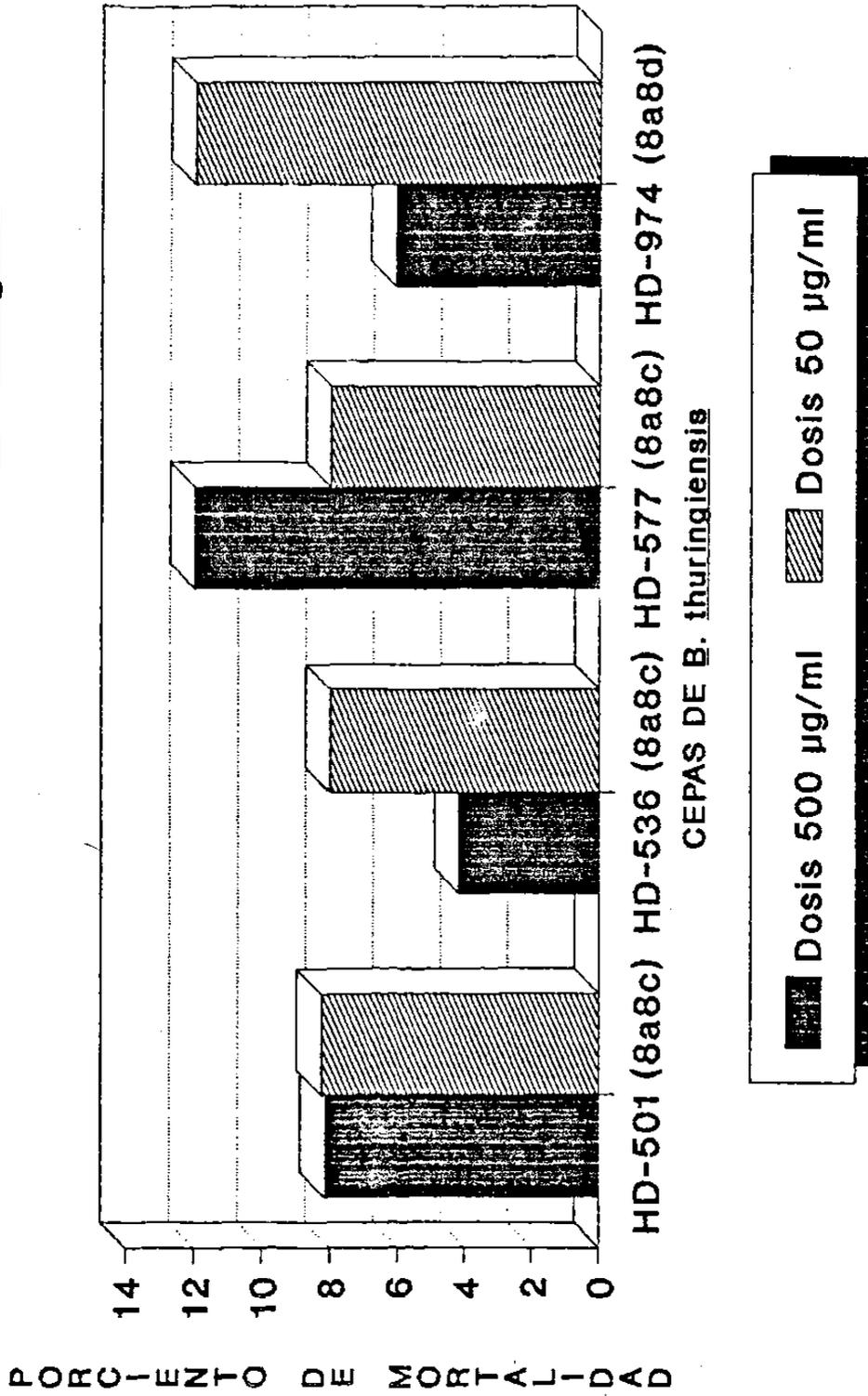


Fig.10 Actividad de extractos de fermentación recientes de cepas HD de B. thuringiensis contra larvas de I. ni

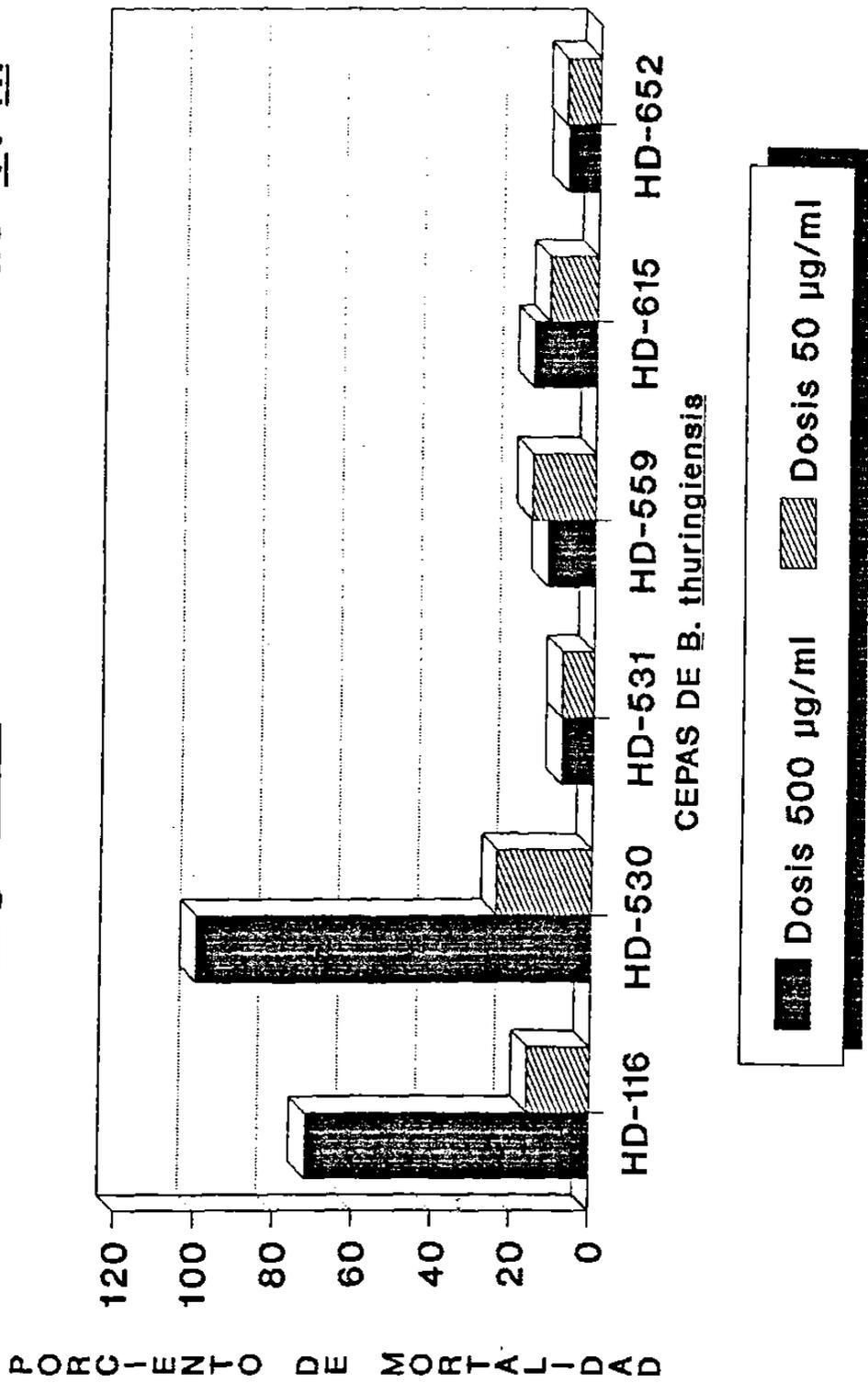


Fig.11 Actividad de extractos de fermentación recientes de cepas HD de B. thuringiensis contra larvas de H. y

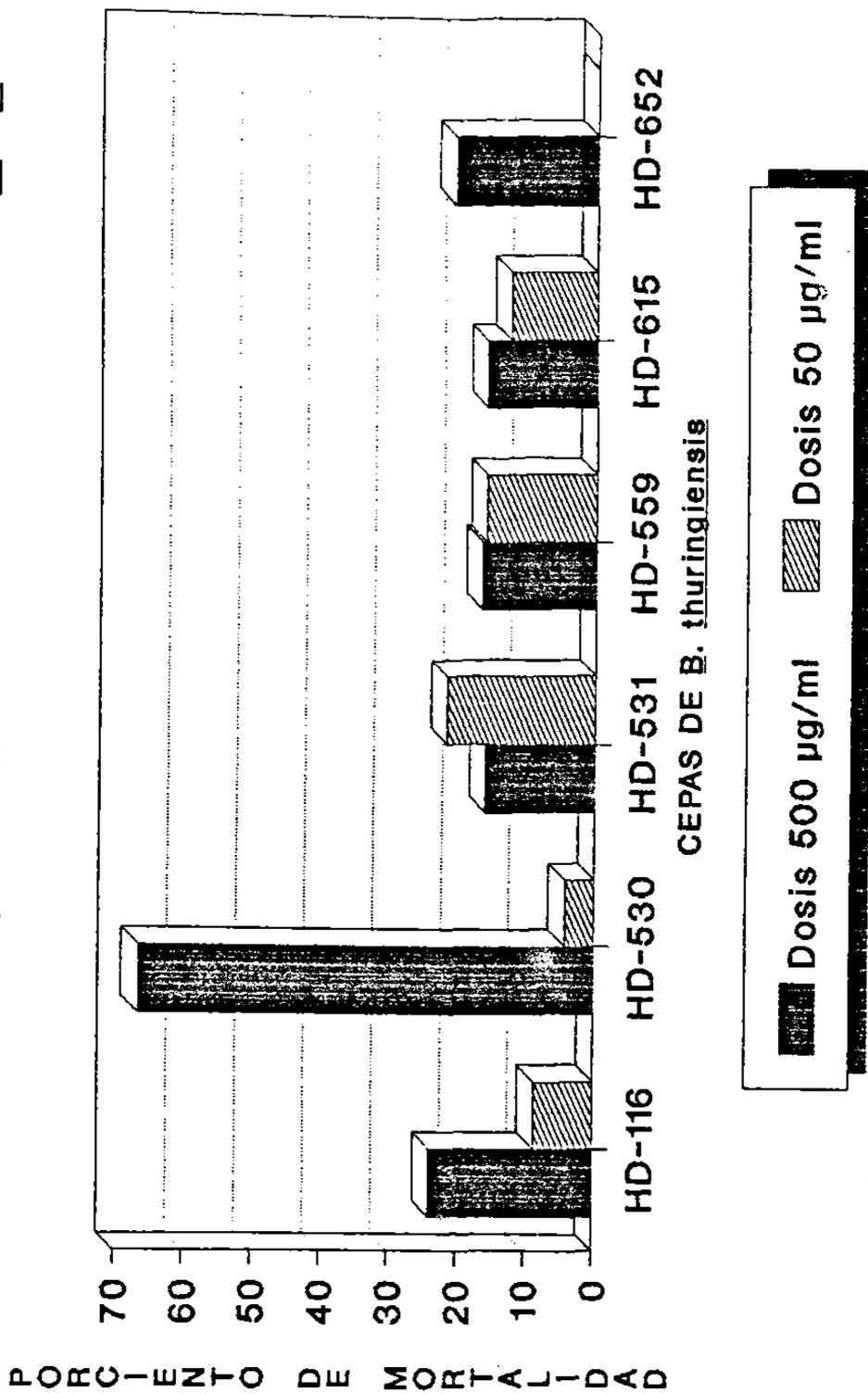


Fig.12 Actividad de extractos de fermentación recientes de cepas HD de B. thuringiensis contra larvas de S. e

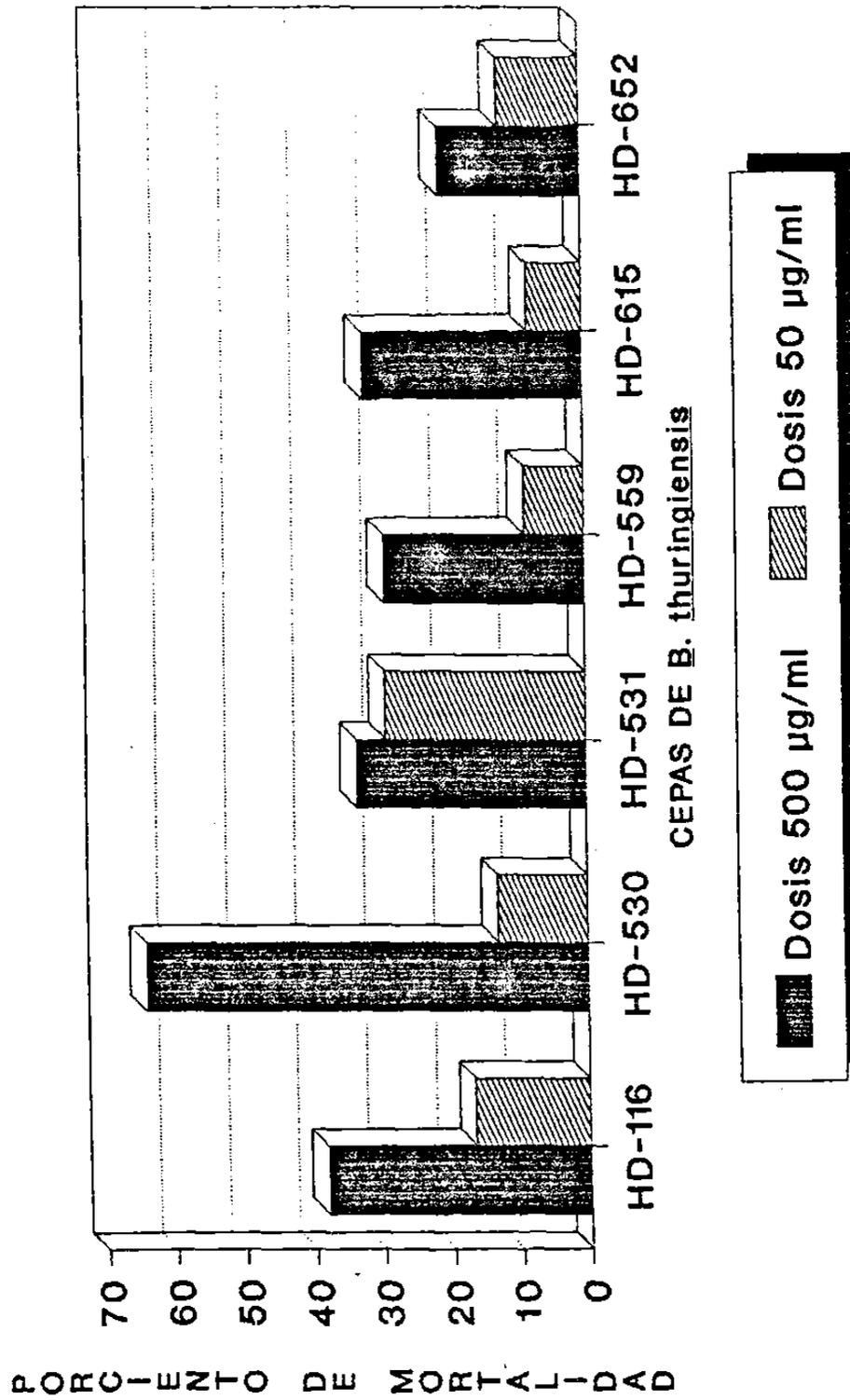


Fig.13 Actividad de extractos de fermentación recientes de cepas HD de *B. thuringiensis* contra larvas de *I. ni*

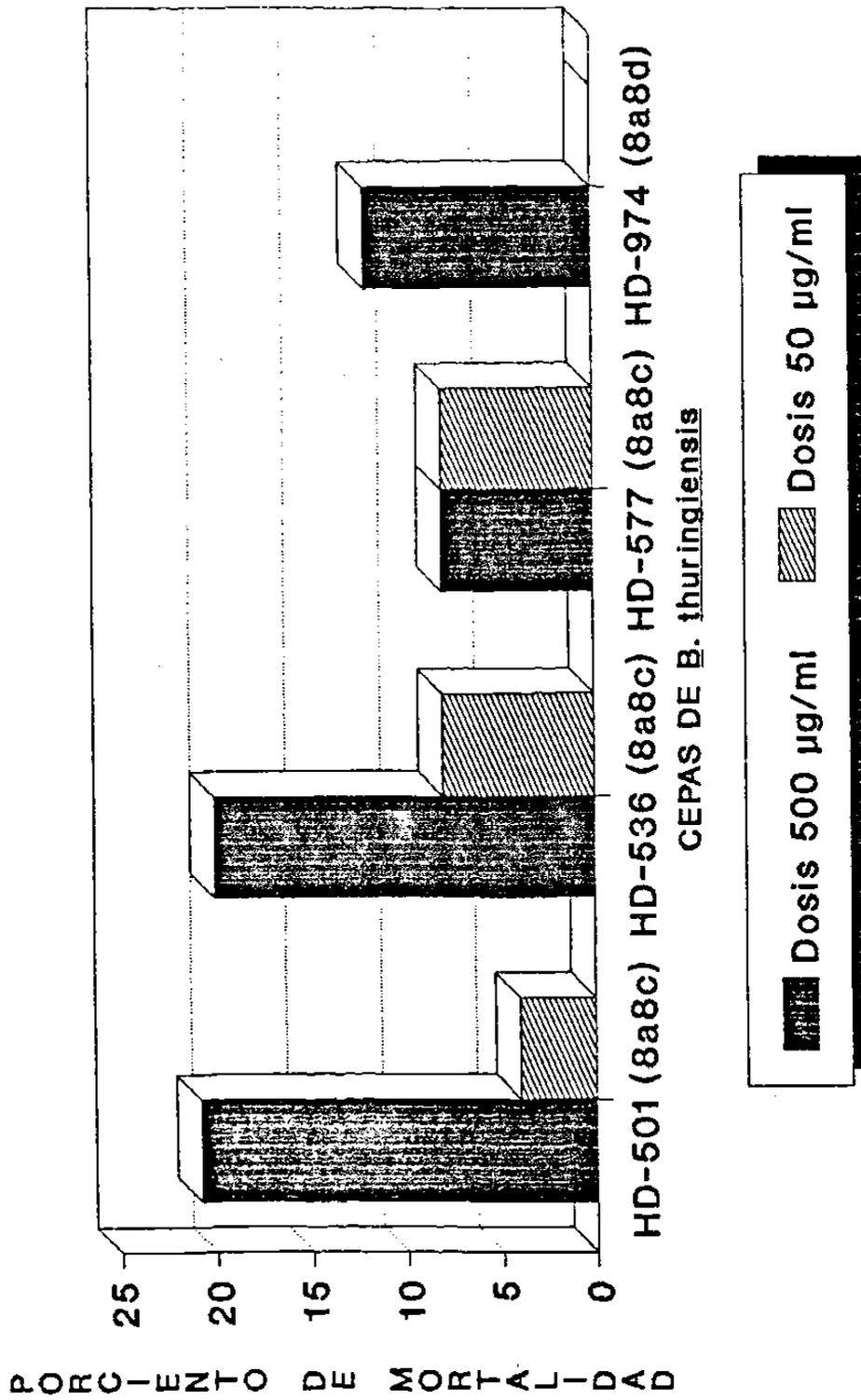


Fig.14 Actividad de extractos de fermentación recientes de cepas HD de B. thuringiensis contra larvas de H. y

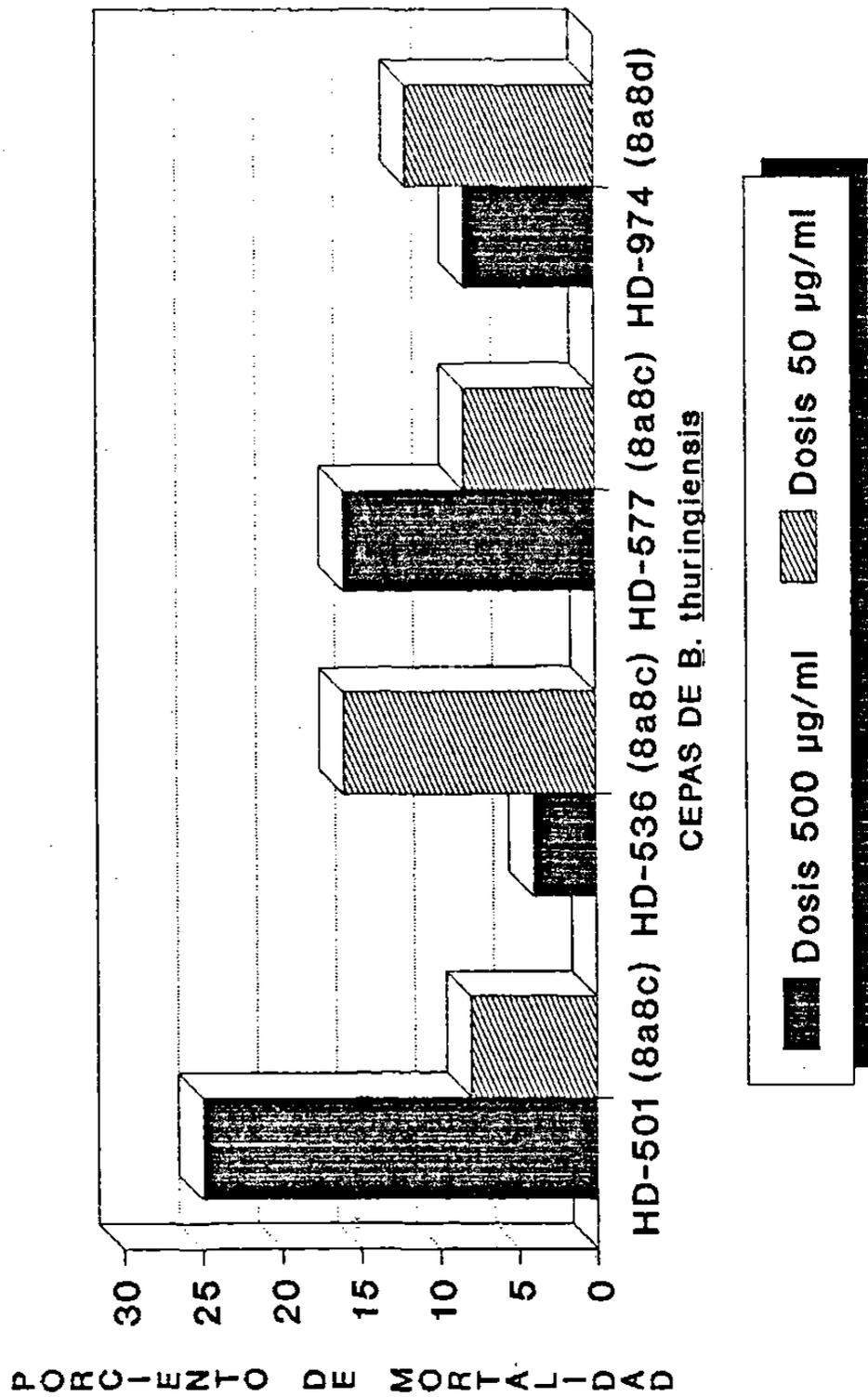


Fig.15 Actividad de extractos de fermentación recientes de cepas HD de B. thuringiensis contra larvas de S. e

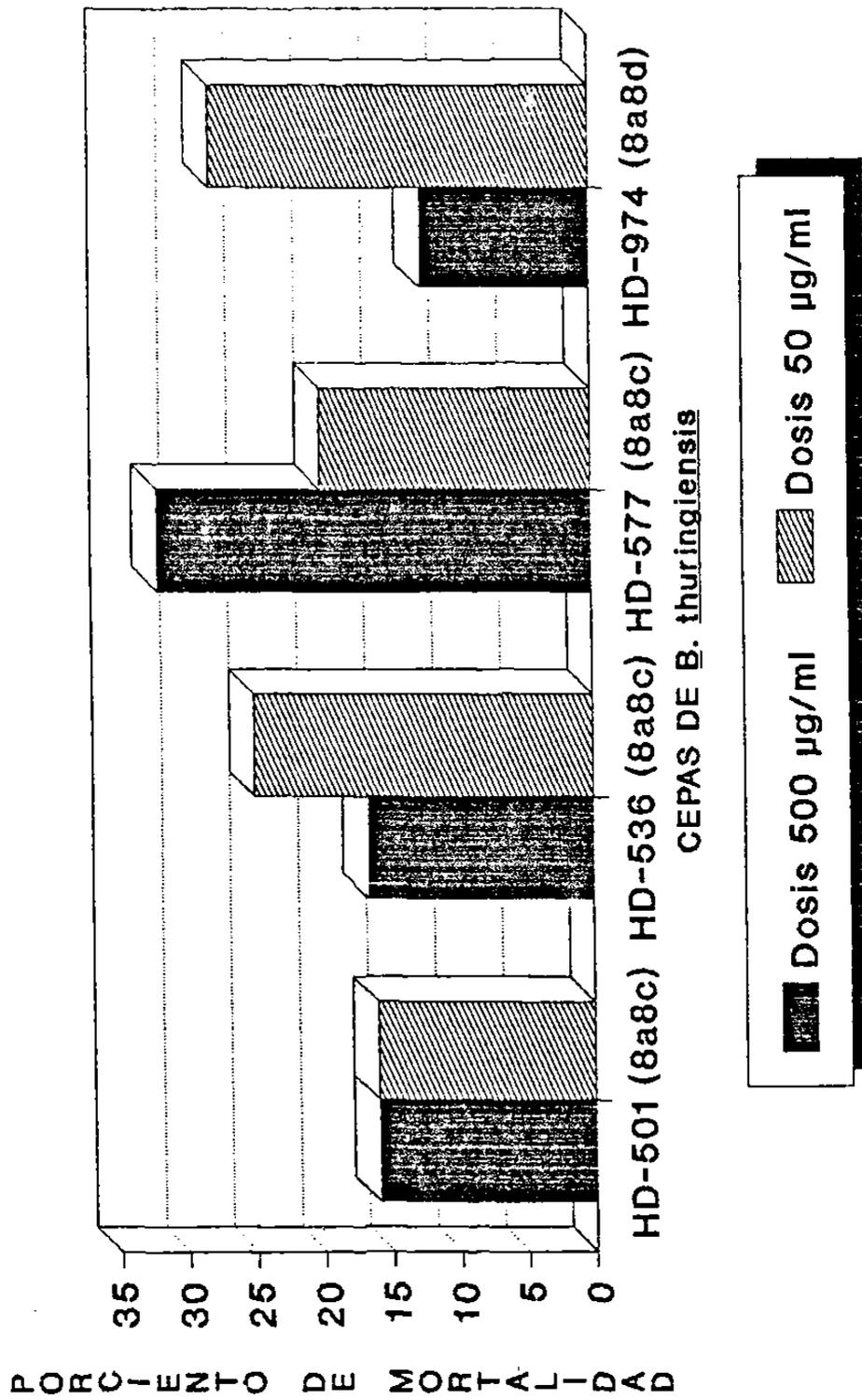


Fig.16 Actividad de cepas de *B. t* a partir de extractos de fermentación almacenados y recientes contra *I. ni*

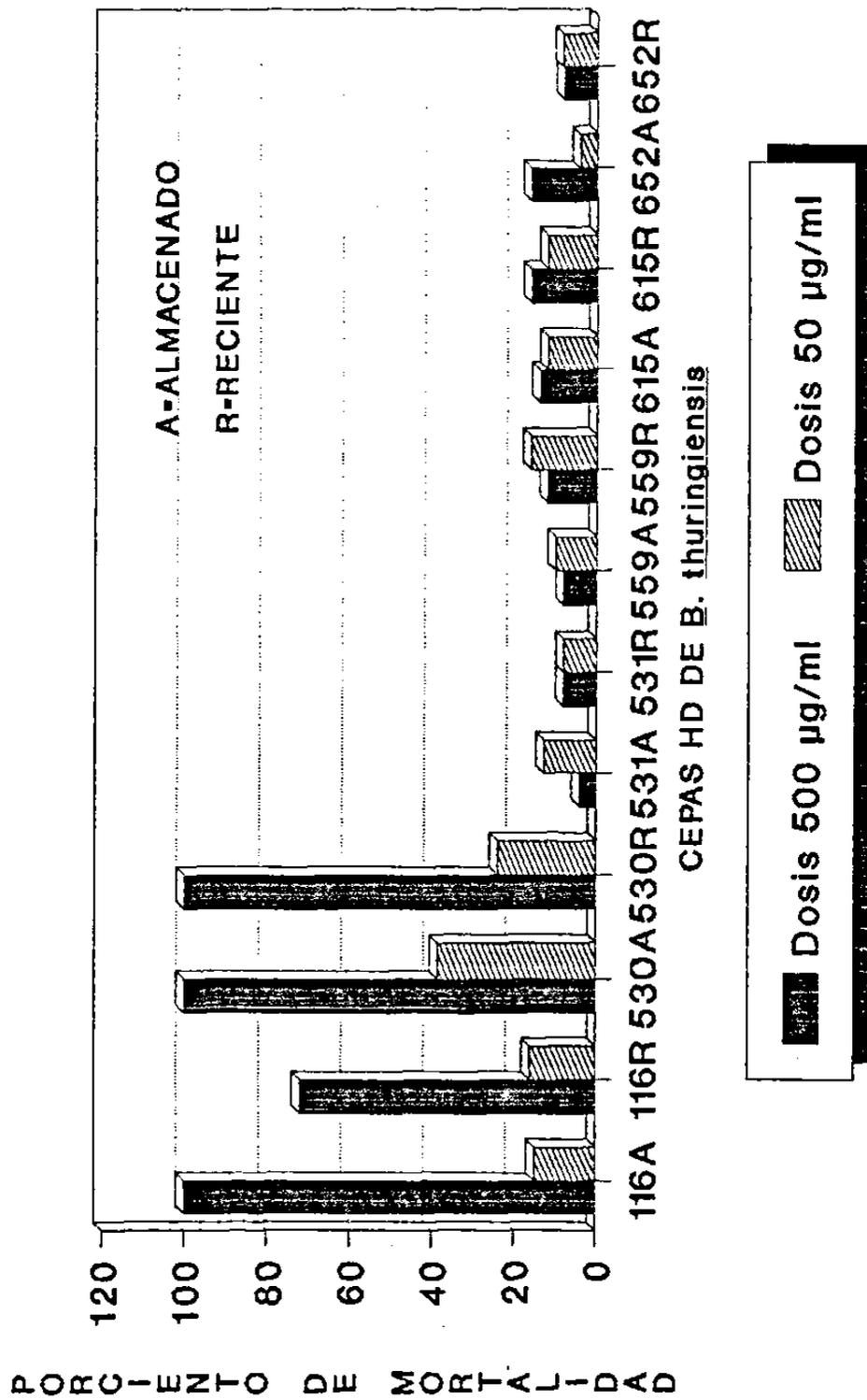
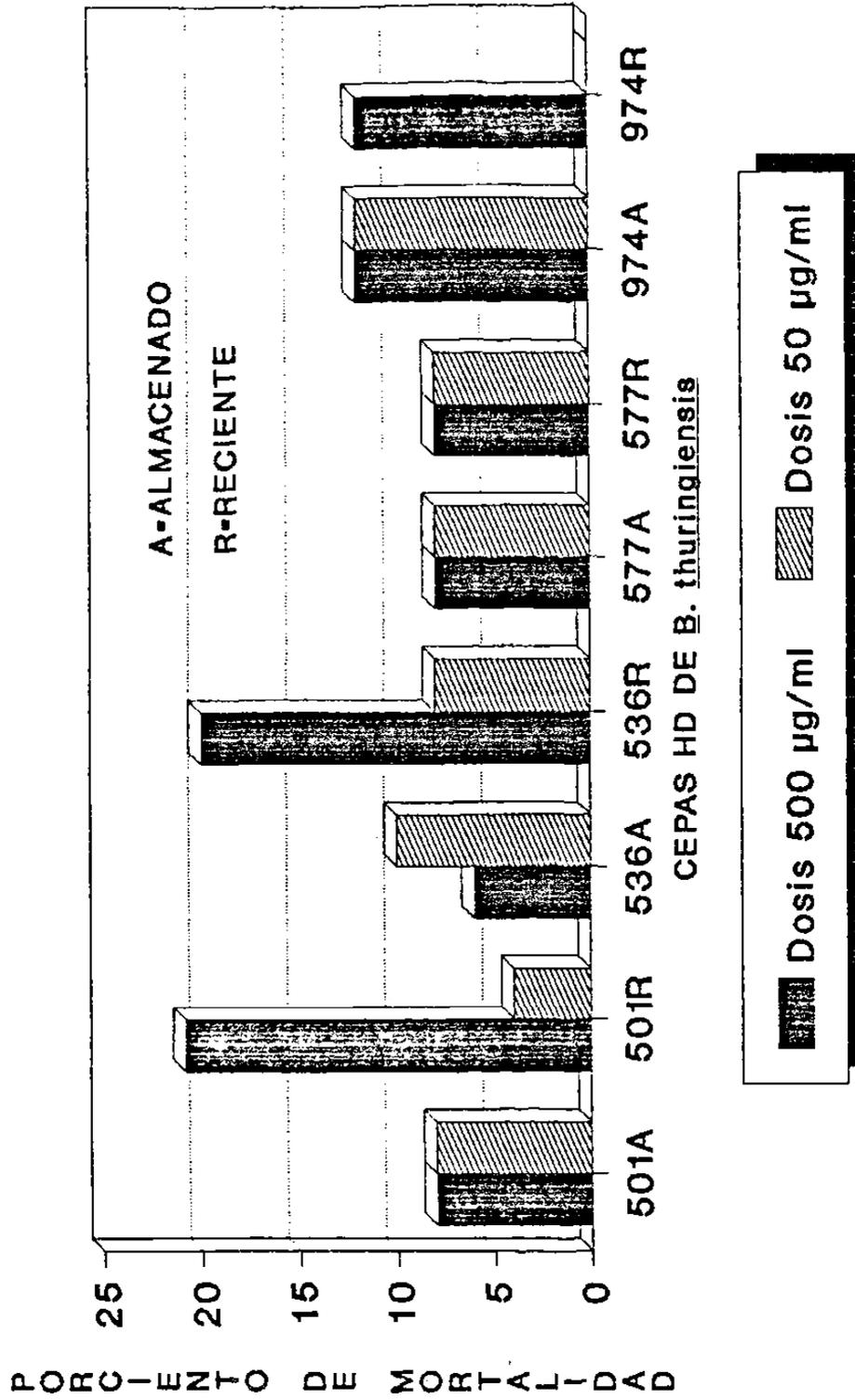
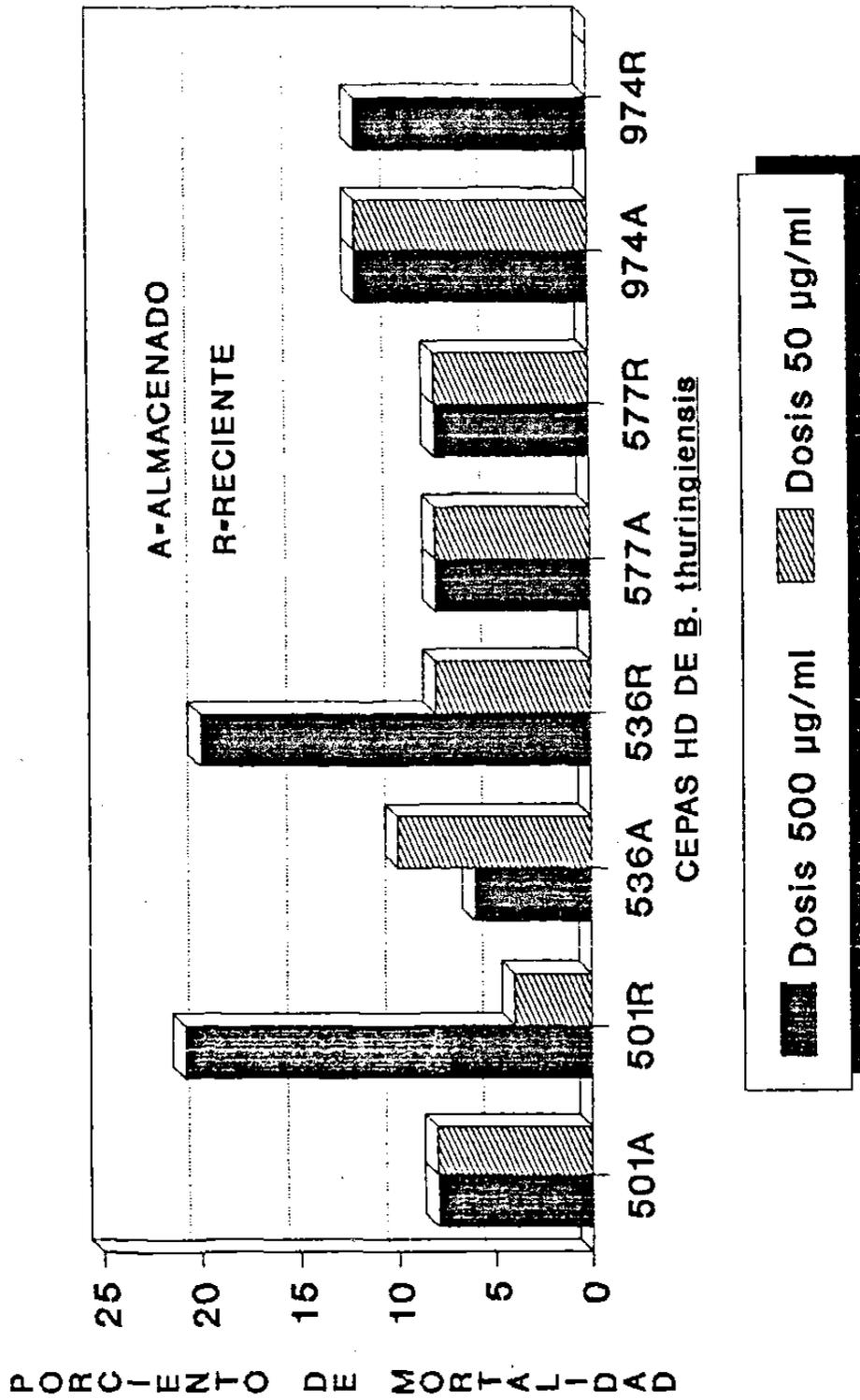


Fig.17 Actividad de cepas de *B. t* a partir de extractos de fermentación almacenados y recientes contra *I. ni*



SEROTIPO 8a8c- cepa 501, 536 y 577
 SEROTIPO 8a8d- cepa 974

Fig.17 Actividad de cepas de B. t
a partir de extractos de fermentación
almacenados y recientes contra I. ni



SEROTIPO 8a8c- cepa 501, 536 y 577
SEROTIPO 8a8d- cepa 974

Fig.18 Actividad de cepas de *B. t* a partir de extractos de fermentación almacenados y recientes contra *H. y*

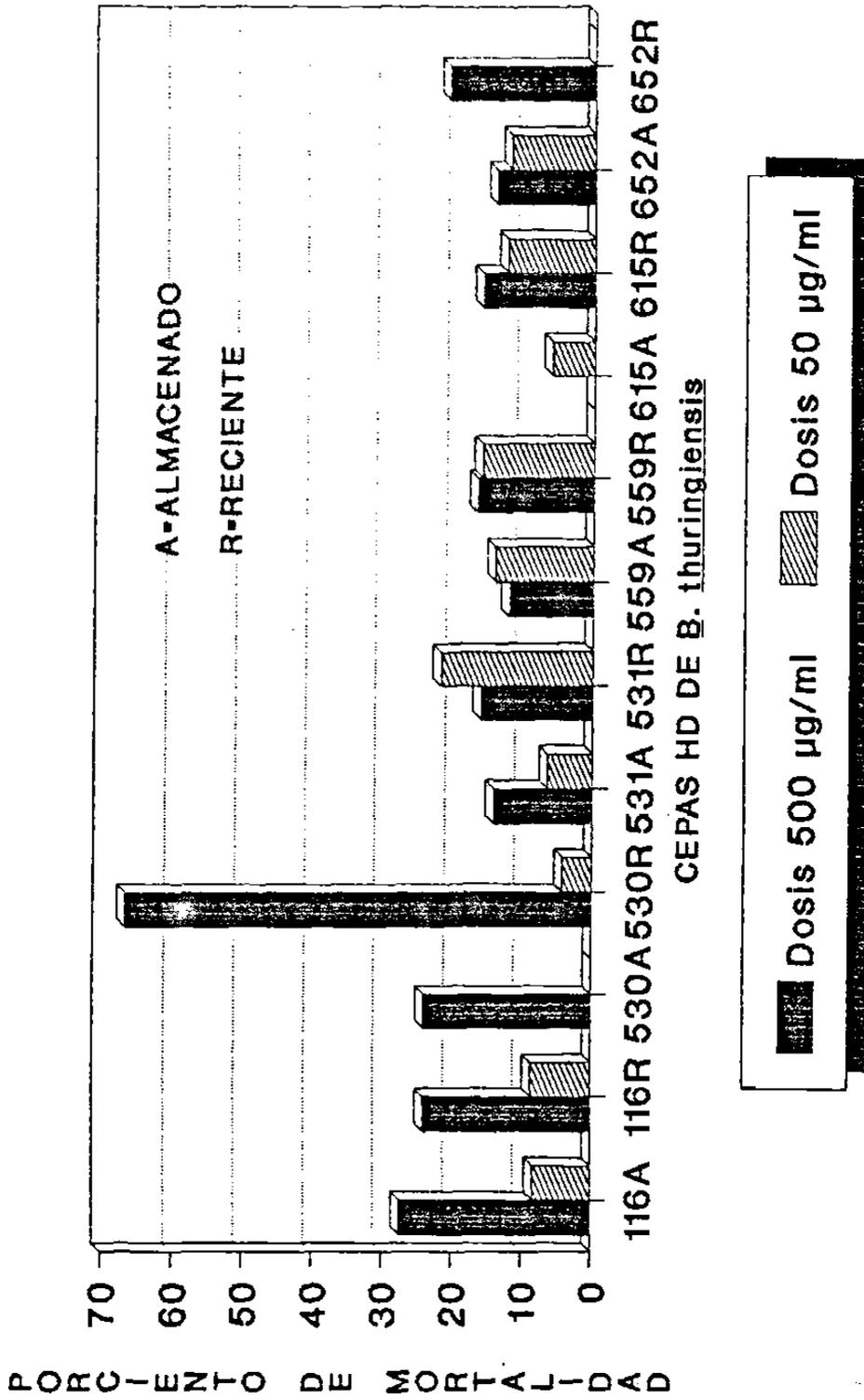
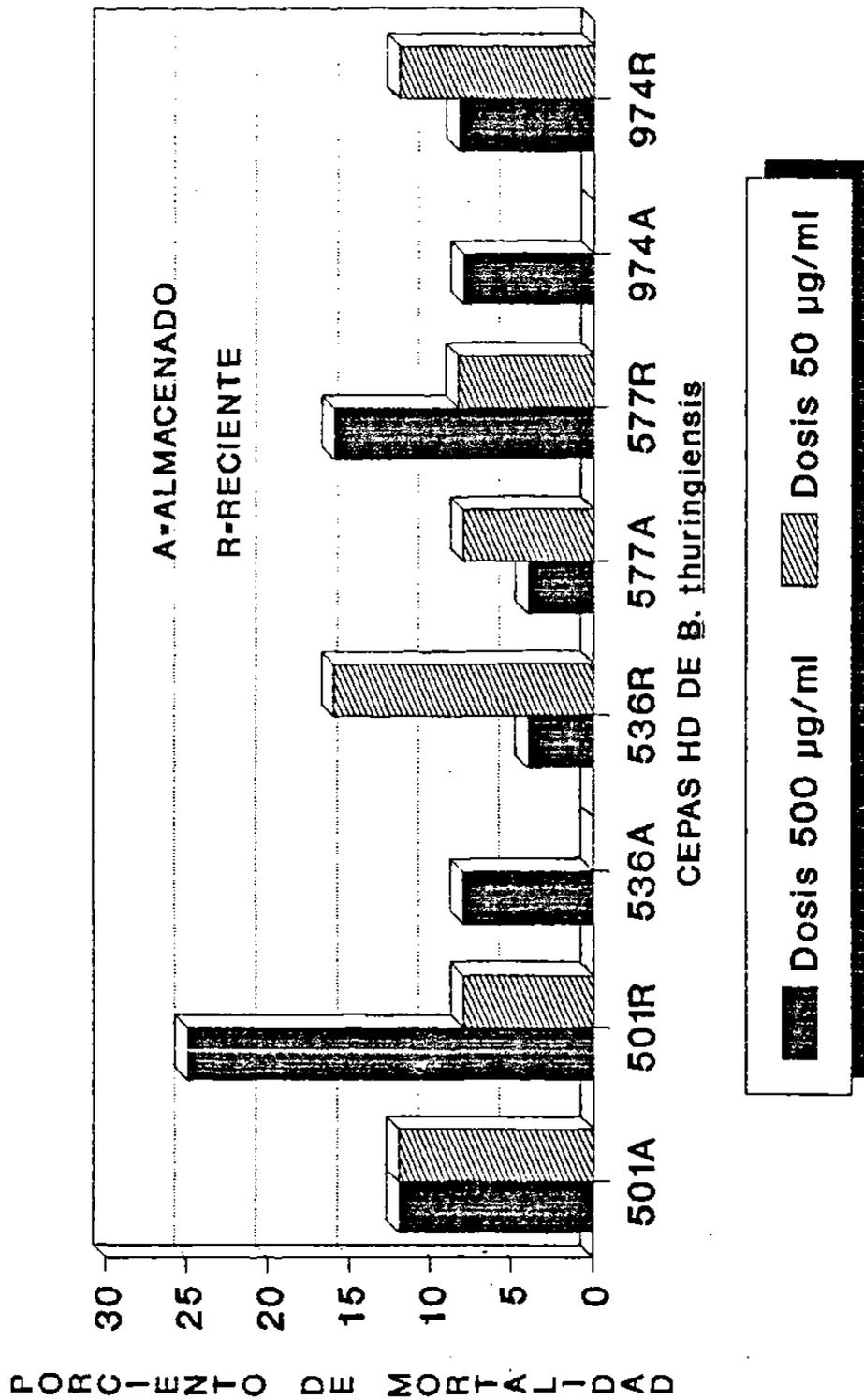


Fig.19 Actividad de cepas de B. t
a partir de extractos de fermentación
almacenados y recientes contra H. y



SEROTIPO 8a8c- cepa 501, 536 y 577
SEROTIPO 8a8d- cepa 974

Fig.20 Actividad de cepas de *B. t* a partir de extractos de fermentación almacenados y recientes contra *S. e*

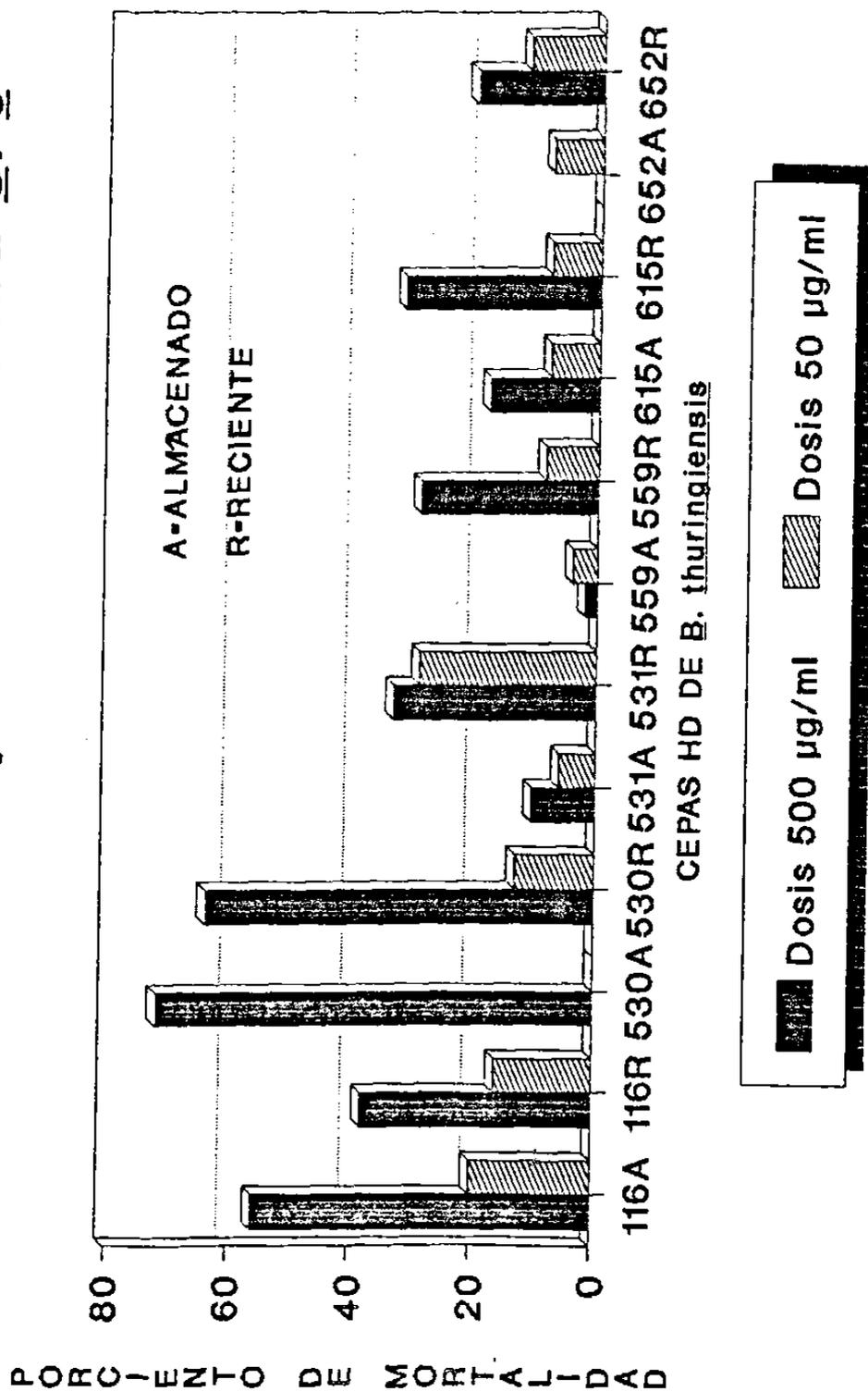
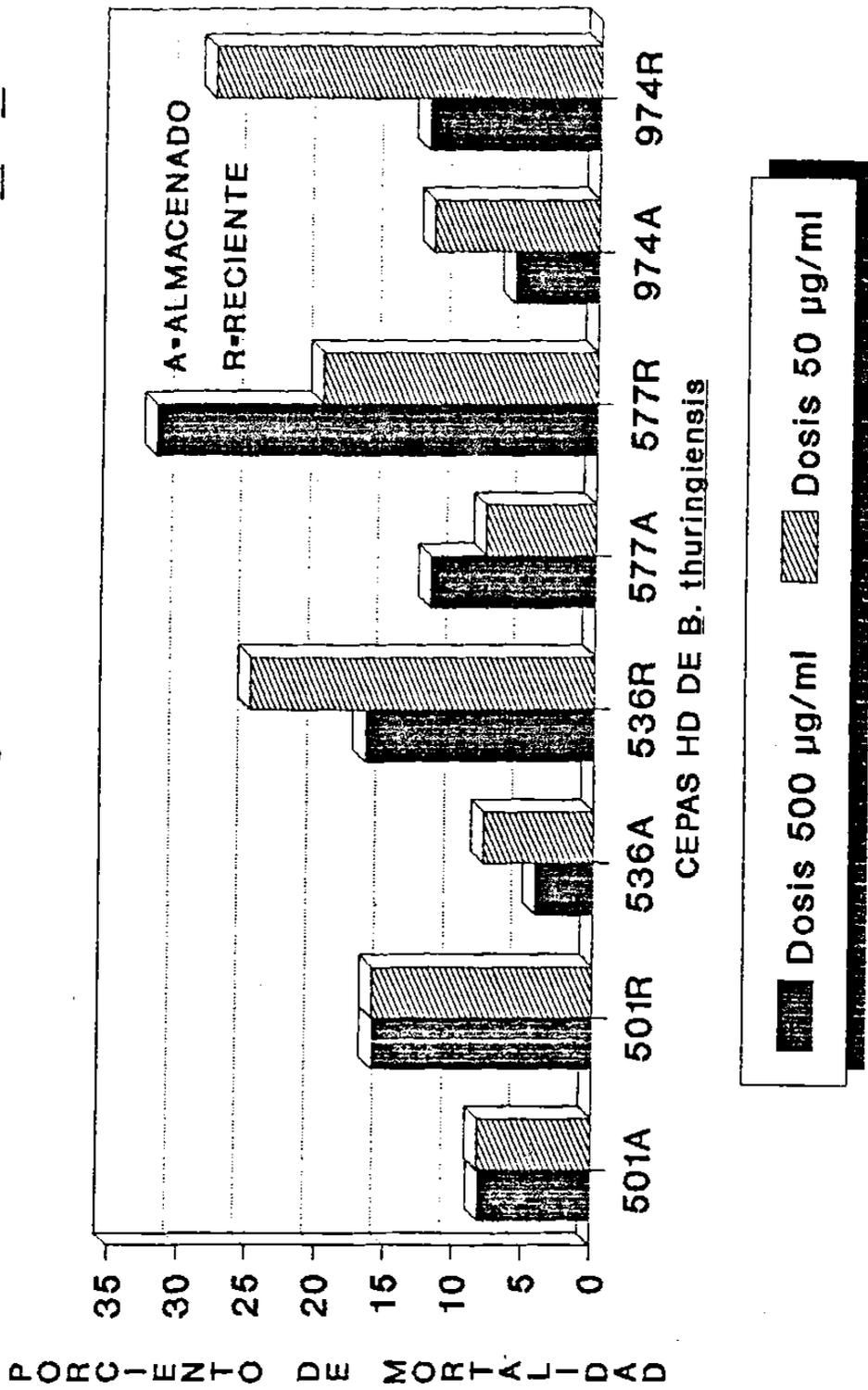


Fig.21 Actividad de cepas de *B. t*
a partir de extractos de fermentación
almacenados y recientes contra *S. e*



SEROTIPO 8a8c- cepa 501, 536 y 577
SEROTIPO 8a8d- cepa 974

Tabla 5.- Potencias de extractos de fermentación de *B. thuringiensis* almacenados y fermentados nuevamente contra larvas de *Trichoplusia ni*.

CEPAS	DL ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	POTENCIA (U.I/mg)
STD HD-1	10.39	18000
HD-116A	35.164	4727.56
HD-116R	163.26	1018
HD-530A	25.71	7272.51
HD-530R	64.78	2565.86

U.I.= Unidades Internacionales por mg de muestra.

A= Extractos Almacenados.

R= Extractos Recientes.

DL= Dosis Letal.

DISCUSION

Los estudios morfológicos del cuerpo paraesporal de cepas de *B. thuringiensis* serotipo H-8a8b revelan que existen cristales de forma bipiramidal en cepas del patotipo A (tóxicas a insectos Lepidópteros), cuerpo paraesporal de forma esférica a ovoide en cepas del patotipo B (tóxicas a insectos Dípteros) y cepas del patotipo C (tóxicas a insectos Coleópteros) con forma del cristal de cuadrada a rectangular (Krieg, 1987). En nuestra cepas encontramos que en la mayoría predominan formas de cristal de cuadrado a rectangular, semejantes al patotipo C, sin embargo, son diferente serotipo y en algunas cepas con forma ovalada (GM-51 y GM-55), mientras que en las cepas HD se encontró cuatro cepas con cristales de forma rectangular y las cepas restantes con cuerpo paraesporal de forma bipiramidal (Tabla 1 y 2). Según lo anteriormente mencionado, esto hace suponer que la mayoría de las cepas GM puedan en un momento dado ser activas contra insectos del orden Coleóptera por el tipo de cristal predominante, sin embargo, en un ensayo preliminar (dato no reportado) se encontró que ninguna cepa presentó actividad contra el escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) después de un período de 96 horas, utilizando dieta artificial y natural y usando una cepa como control positivo para este insecto. De igual forma, las cepas se comportaron sin actividad al realizar bioensayo con larvas de insectos Dípteros (*Culex* spp), después de 48 horas de prueba. En nuestro estudio con insectos Lepidópteros, las cepas GM se manifestaron con muy poca actividad, mientras que las dos cepas HD con forma de cristal bipiramidal presentaron alta actividad principalmente contra larvas de *T. ni*, correspondiendo al serotipo H-8a8b subespecie *morrisoni* del patotipo A. Al respecto, Ohuba M y K. Aizawa 1986, menciona que la selección por el tipo de cristal no determina a que insecto son tóxicos y encuentra que no hay correlación entre la forma del cristal y la toxicidad. Sin embargo, Martin y Travers 1989, realizan aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* a partir del suelo y agrupa cepas con cristal bipiramidal como tóxicas a insectos Lepidópteros y cepas con

cristal irregular como toxicas a mosquitos.

De las anteriores investigaciones realizadas con las cepas GM, encontramos los trabajos realizados por Gómez en 1987 y Galán en 1990 con la cepa GM-2, la cual reportan sin actividad hacia larvas de *T. ni* el cual es el único reporte con este insecto. En nuestro trabajo encontramos que la mayor toxicidad que presentó GM-2 fue de 12 % de mortalidad con una concentración de 500 µg/ml. Por otra parte, Castro en 1985 prueba cepas GM del serotipo H-8 tal como, GM-20, GM-24, GM-26, GM-27 y GM-29 en los que encuentra porcentajes de mortalidad ligeramente superior a los mencionados en el presente trabajo con *H. virescens*. Mientras que para *S. exigua* no se tienen reportes de toxicidad y solamente se han evaluado las cepas GM contra larvas de *S. frugiperda* encontrándose que todas las cepas presentaron una mortalidad inferior al 50 por ciento, en nuestro estudio las cepas GM contra *S. exigua* se manifestaron con actividad tóxica baja con excepción de la cepa GM-55, la cual se comportó como una de las mejores cepas contra este insecto. Por todo lo mencionado anteriormente se pone de manifiesto que todas las cepas autóctonas GM recuperadas de México y los extractos de fermentación de las cepas HD de la variedad *ostriniae* y *nigeriensis* se encontró sin una buena actividad contra los tres insectos evaluados, y se refleja en la escasa información que hay al respecto sobre estos serotipos, ya que su baja mortalidad reafirmada en esta investigación, los hacen poco atractivo para realizar desarrollos futuros con este fin y como consecuencia llevar a cabo desarrollo biotecnológico más a fondo. Al respecto (Ohba Y y K. Aizawa, 1986) ha demostrado que en el medio ambiente natural *B. thuringiensis* formadores de cristal paraesporal no tóxicos son más ampliamente distribuidos que los *B. thuringiensis* de cristal proteico tóxicos a insectos, lo que indica que *B. thuringiensis* como grupo es más bien no tóxico a insectos Lepidópteros.

Por otra parte, dentro de las cepas internacionales de *B. thuringiensis* HD evaluadas pertenecientes al serotipo H-8a8b subespecie *morrisoni* se encontró que solamente dos cepas (HD-116 y HD-530) que presentaron actividad tóxica superior al 50 por ciento

de mortalidad contra larvas de *T. ni* con dosis de 500 μ g/ml, mientras que las cepas restantes del mismo serotipo se manifestaron con baja actividad tóxica, al igual que la cepa GM-2 de la misma subespecie. Estos resultados, indican que dentro de una misma subespecie pueden existir cepas con diferente actividad hacia un insecto blanco determinado. Lo cual se confirma por lo mencionado por Jaquet en 1987 en donde encuentra diferentes actividades específica del cristal proteico entre cepas de *B. thuringiensis* de la misma subespecie como por ejemplo *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* o *thuringiensis*, se menciona que la toxina de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* fue muy activa contra larvas de *P. brassicae*, mientras que la toxicidad para larvas de *S. litoralis* y *H. virescens* fué muy débil. Además es importante señalar que las cepas al ser evaluada deben ser del mayor número posible para poder encontrar y seleccionar al menos una cepas con capacidad entomatógena hacia los insectos blancos de importancia agrícola. Esto se confirma por el trabajo de Kalfon y de Barjac en 1985 en el que prueban un total de 900 cepas de *B. thuringiensis* , encontrando pocas cepas con alta actividad contra *S. litoralis* y solamente una presentó buen control bajo condiciones de campo.

Con lo que respecta a la evaluación y selección de cepas a partir de extractos de fermentación almacenados y extractos de fermentación recientes se observó que existe muy poca diferencia entre uno y otro en el porciento de mortalidad y solamente en la cepa HD-530 se manifestó un incremento en la actividad tóxica contra larvas de *H. virescens* (fig.16, 17, 18, 19, 20 y 21). De estos resultados se deduce, que probablemente el tiempo de almacenaje no afecta notablemente la toxicidad de una cepa de *B. thuringiensis* aunque cabe mencionar que las condiciones de fermentación de los extractos almacenados fueron muy diferentes a los realizados en el presente trabajo, principalmente el medio de fermentación utilizado, ya que este puede influir en la actividad tóxica que pueda tener una cepa determinada.

CONCLUSIONES

1.- La mayoría de las cepas GM evaluadas contra tres plagas agrícolas presentaron mortalidad inferior al 50 por ciento.

2.- La cepa GM-55 serotipo H-8a8c variedad *nigeriensis* fue la que presentó mayor toxicidad, para la cual se encontró un 50 % de mortalidad en la dosis de 500 µg/ml principalmente hacia larvas de *S. exigua*.

3.- En extractos de fermentación de las cepas HD evaluadas, solamente la HD-116 y HD-530 serotipo 8a8b variedad *morrisoni* presentaron 100 por ciento de mortalidad con dosis de 500 µg/ml contra larvas de *T. ni*. Otras cepas que pertenecen a el mismo serotipo pueden existir con diferente patrón de toxicidad para controlar un insecto plaga determinado.

4.- Dentro del serotipo H-8a8c y H-8a8d se encuentran cepas con actividad tóxica muy pobres y no atractivos para controlar insectos plaga de importancia agrícola.

5.- Los extractos de fermentación almacenados mantienen la misma actividad tóxica que los extractos de fermentación recientes de *B. thuringiensis* contra los tres insectos evaluados con excepción de la cepa HD-530 que presentó un incremento de 42 % contra larvas de *H. virescens*.

6.- El número de cepas a ser evaluadas deben de incrementarse para obtener al menos una cepa con buenas probabilidades para usarse en control biológico de insectos plaga.

LITERATURA CITADA

- 1.- Aizawa K. 1987. Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. Edited by Borges y Hussey, Academic Press. In *Microbial Control of Insects and Mites*. London. pp. 655-672.
- 2.- Aranson A.L., W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- 3.- Castro A.J. 1982. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-1 y GM-2 en *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: noctuidae). F.C.B, U.A.N.L. (tesis inédita).
- 4.- Castro P.E. 1985. Toxicidad de trece nuevos aislados a partir de suelo y larvas enfermas de *Bacillus thuringiensis* (GM-20 a GM-32). F.C.B., U.A.N.L. (tesis inédita).
- 5.- Daust R.A. 1989. Commercialization of bacterial insecticides. Ecogen Inc. Langhorne, Pennsylvania. 7-11.
- 6.- de Barjac and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 35: 233-240.
- 7.- Donovan W.P., J.M. Gonzalez, M.P. Gilbert and C. Dankocsik. 1988. isolation and characterization of EG2158 a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae and nucleotide sequence of the toxin gene. *Mol. Gen. Genet.* 214: 365-372.
- 8.- Dulmage H.T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 232-239.
- 9.- Dulmage H.T., J.A. Correa and A.J. Martínez. 1970. Coprecipitation with lactose a means of revering the spore-

crystal complex of *B. thuringiensis*. J. Invertebr. Path. 15: 15-20.

- 0.- Dulmage H.T., A.J. Martínez and T. Peña. 1976. Bioassay of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) δ - endotoxin using the Tobacco Budworm. Technical Bull. 1528. U.S. Dept. of Agriculture. 1-15
- 1.- Dulmage H.T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis* perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 84 supl. III. 113-122.
- 2.- Ferro D.N. and W.D. Gelernter. 1989. Toxicity of a new strains of *Bacillus thuringiensis* to Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 82 (3); 750-755.
- 3.- Finley D.J. 1971. Probit analysis. 3rd. ed. Cambridge University Press. Cambridge, England.
- 4.- Galán J.L., C. Rodriguez, R.S. Tamez, M. Gómez y H.T. Dulmage. 1990. GM-2 a new subspecies of *Bacillus thuringiensis* (n. subsp. *coahuilensis*) with an unusual form of parasporal inclusion body. Publ. Biol. F.C.B., U.A.N.L. Mex. 4: 53-58.
- 5.- Galjart N.J., N. Siuasubramanian and B.A. Federici. 1987. Plasmid location, cloning and sequence analysis of the gene encoding a 27.3 kilodalton cytolytic protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14). Current. Microbiol. 16: 171-177.
- 6.- Gil S.S., J.M. Hornung, J.E. Ibarra, G.J. Singh and B.A. Federici. 1987. Cytolytic activity and immunological similarity of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* isolate PG-14

toxins. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1251-1256.

- 17.- Gómez M. 1989. La delta endotoxina de *Bacillus thuringiensis* GM-2. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. (tesis inédita).
- 18.- Hall I.M., K.Y. Arakawa, H.T. Dulmage and J.A. Correa. 1977. The pathogenicity of strains of *Bacillus thuringiensis* to larvae of *Aedes* and to *Culex* mosquitoes. Mosquito News. 37: 246-251.
- 19.- Hernández J.L. 1984. Patogenicidad de cinco cepas de *Bacillus thuringiensis* en *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) al utilizar medios de cultivo en base al agua de coco. F.C.B., U.A.N.L. (tesis inédita).
- 20.- Hernández J.L. 1988. Evaluation de la toxicite de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. Entomophaga. 32: 163-171.
- 21.- Herrnstadt C., G.G. Soares, E.R. Wilcox and D.L. Edwards. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. Biotechnology. 4: 305-308.
- 22.- Herrnstadt C., F. Gaertner, W. Galernter and D.L. Edwards. 1987. *Bacillus thuringiensis* isolate with activity against coleoptera. Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture. 101-113.
- 23.- Hofte H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- 24.- Ignoffo C.M., C. García and M. Kroha. 1982. Susceptibility of the colorado potato beeatle *Leptinotarsa decemlineata* to *Bacillus thuringiensis*. J. Invert. Path. 39: 244-246.

- 25.- Jaquet F., R. Hutter and P. Luthy. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 53: 500-504.
- 26.- Krieg A.V., A.M. Huger, G.A. Langenbruch and W. Schnetter. 1983. Neue ergebnisse uber *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* unter besonderer berucksichtigung seiner wirkung auf den kartoffelkafer (*Leptinotarsa decemlineata*). Anz. Schadlingskde, Pflanzenschutz, umweltschutz. 57: 145-150.
- 27.- Kalfon A.R. and H. de Barjac. 1985. Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. Entomophaga. 30: 177-186.
- 28.- Krieg A., W.Schnetter, A.M. Huger and G.A. Langenbruch. 1987. *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* strain B 1256-82 a third pathotype with in the serotype 8a8b. System. Appl. Microbiol. 9: 138-141.
- 29.- Lambert B. and M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. BioScience. 42: 112-122.
- 30.- Li J., R. Henderson, J. Corroll and A. Ellar. 1988. X-ray analysis of the crystal line paraesporal inclusion in *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. J. Mol. Biol. 199: 543-544.
- 31.- Martin P.W. and R.S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolate. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2437-2442.
- 32.- McPherson S.A., F.J. Perlak, R.L. Fushs, P.G. Marrone, Laurik and D.A Ficchhoff. 1988. Characterization of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis*

var. *tenebrionis*. Biotechnology. 6: 61-66.

- 33.- Nakamura L.K. and H.T. Dulmage. 1988. *Bacillus thuringiensis* cultures available from the U.S. Department of Agriculture. Technical Bolletin 1738 U.S.D.A. 1-38.
- 34.- Ohba M. and K. Aizawa. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. J. Invertebr. Pathol. 47; 12-20.
- 35.- Ohba M., Y.M. Yu and K. Aizawa. 1989. Monoclonal antibodies against the 65-kilo dalton mosquitocidal protein of the *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a8b). J. Gen. Appl. Microbiol. 35: 21-26.
- 36.- Padua L.E. and B.A. Federici. 1990. Development of mutants of the mosquitocidal bacterium *Bacillus thuringiensis* subspecies *morrisoni* (PG-14) toxic to lepidopterous and Dipterous insect. FEMS Microbiol. Lett. 66: 257-262.
- 37.- Raulston J.R. and P.D. Lingren. 1972. Methods for large scale rearing of the tobacco budworm. U.S. Dept. Agri. Prod. Res. Rep. No. 145: 1-10.
- 38.- Rodríguez P.C. y J.L. Galán Wong. 1992. Colección Internacional de bacilos Entomopatógenos: catalogo de *Bacillus thuringiensis* aislados y extractos, clasificación por antígeno H. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. (México).
- 39.- Riethmuller U. and G.A. Langenbruch. 1989. Two bioassay methods to test the efficacy of *Bacillus thuringiensis* subspec. *tenebrionis* against the larvae of the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). Entomophaga. 34: 237-245.

- 40.- Rupak M.J., W.P. Donovan, R.G. Groat, A.C. Slaney, J.W. Mattison, T.B. Johnson, J.F. Charles, V.C. Dumanoir and H. deBarjac. 1991. Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. *Appl. Environ. Microbiol.* 57; 3337-3344.
- 41.- Thiery I. 1987. Similarities between crystal protein subunits of *Bacillus thuringiensis* strain 1884 serotype H 14 and strain PG-14 serotype H 8a8b and their relationship with mosquitocidal activity. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 457-470.
- 42.- vanFrankenhuyzen K and F. Ortiz. 1990. Thirty years of *Bacillus thuringiensis* pays off. *Forest Pest Managment Institute.* 9: 2-8.
- 43.- Yu Y.M., M. Ohba and K. Aizawa. 1987. Synergistic effects of the 65 and 25 kilodalton proteins of *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a8b) in mosquito larvicidal activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 33: 459-462.
- 44.- Yu Y.M., M. Ohba, K. Aizawa and L.E. Padua. 1987. Mosquito larvicidal and hemolytic proteins purified from parasporal inclusions produced by *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a8b). *System. Appl. Microbiol.* 9: 320-323.
- 45.- Yu Y.M., M. Ohba and K. Aizawa. 1988. Affinity purification of a 65-kilodalton parasporal protein from *Bacillus thuringiensis* PG-14 that shows mosquitocidal activity. *Antonie van Leeuwenhoek.* 54: 257-265.
- 46.- Yu Y.M., and K. Aizawa. 1989. Monoclonal antibodies against the 65 kilodalton mosquitocidal protein of the *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a8b). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25: 21-26.

- 47.- Yu Y.M., M. Ohba and K. Aizawa. 1989. The 25-Kilodalton hemolytic protein affinity purified from parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a8b). *Current. Microbiol.* 18: 243-246.
- 48.- Zehnder G.W. and W.D Gelernter. 1989. Activity of the M-one formulation of a new strains of *Bacillus thuringiensis* against the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): relation ship between susceptibility and insect life stage. *J. Econ. Entomol.* 82 (3): 756-761.

ABREVIATURAS.

KDa.....	kilodalton.
SDS-PAGE.....	electroforesis en gel de poliacrilamida.
$\mu\text{g/ml}$	microgramo por mililitro.
ng/ml	nanogramo por mililitro.
LC_{50}	concentración letal media.
DE_{50}	dosis efectiva media.
DL_{50}	dosis letal media.
U.I.....	unidad internacional.
%.....	por ciento.
\pm	más- menos.
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados.
g.....	gramos.
rpm.....	revoluciones por minuto.

