

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Selección y Caracterización de Cepas de *Bacillus thuringiensis* Tóxicas contra *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Herbst) y *Oryzaephilus surinamensis* (L)

## TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias  
con especialidad en Biotecnología

PRESENTA:

M.C. Ernesto Javier Sánchez Alejo

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. DICIEMBRE 2001

**Selección y Caracterización de Cepas de *Bacillus thuringiensis*  
Tóxicas contra *Tribolium castaneum* (Coleoptera:  
Tenebrionidae) (Herbst) y *Oryzaephilus surinamensis* (L.)**

TD  
SB190  
.S2  
2001  
c.1

**2001**

**EJSA**



1080124486

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



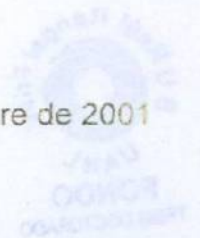
**Distribución y Caracterización de *Trichogramma (Trichogramma) duringiensis***  
**contra *Trioxys (Trioxys) spangleri* (Hymenoptera: Enebrionidae)**  
**(Herbat) y *Trioxys (Trioxys) spangleri* (Hymenoptera: Enebrionidae)**

**TESIS**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de**  
**Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología**

**Presenta**

**M.C. Ernesto Javier Sánchez Alejo**



TD  
SB190  
.52  
2001



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Selección y Caracterización de Cepas de *Bacillus thuringiensis***  
**Tóxicas contra *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)**  
**(Herbst) y *Oryzaephilus surinamensis* (L).**

**TESIS**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de**  
**Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología**

**PRESENTA**

**M.C. Ernesto Javier Sánchez Alejo**

**COMISIÓN DE TESIS APROBADA**

Dr. Benito Pereyra Alférez                      Presidente

Dr. Carlos E. Hernández Luna                      Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong                      Vocal

Dr. Hugo A. Luna Olvera                      Vocal

Dra. Lilia H. Morales Ramos                      Vocal

**El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Genética y  
Biología Molecular de Microorganismos,  
Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo.  
Departamento de Microbiología e Inmunología.  
Facultad de Ciencias Biológicas/ Universidad Autónoma de  
Nuevo León bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez**

# CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE FIGURAS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	5
ANTECEDENTES.....	6
El control biológico de insectos.....	6
Los bioinsecticidas en el control biológico de insectos.....	7
<i>Bacillus thuringiensis</i> como agente de control biológico de insectos.....	8
Caracterización de Bt.....	9
Clasificación de las toxinas de Bt.....	9
Estructura molecular de la $\delta$ -endotoxina.....	11
Modo de acción de la $\delta$ -endotoxina.....	12
El control de coleópteros a través de Bt.....	18
El gorgojo castaño de la harina y el gorgojo aserrado de los granos.....	20
El ciclo de vida <i>Tribolium castaneum</i> y <i>Oryzaephilus Surinamensis</i> .....	22
Efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento del insecto..	23
Efecto de los factores nutricionales sobre el crecimiento del insecto	24
La cría de <i>Tribolium castaneum</i> y <i>Oryzaephilus Surinamensis</i> .....	25
Control de gorgojos en el almacén.....	25
Control químico.....	26



Control físico .....	26
Resistencia a Insecticidas.....	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
Aislamiento de las cepas contra coleópteros.....	28
Identificación de la cepa .....	28
Determinación de proteína total.....	30
La purificación del cristal proteico.....	30
La inmunodetección de proteínas CryIII.....	32
Bioensayo.....	32
Perfil de plásmidos.....	33
Resistencia a los antibióticos.....	34
Determinación de la $\beta$ -exotoxina.....	35
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
Aislamiento de las cepas de Bt.....	36
Identificación de las cepas .....	36
La inmunodetección de proteínas CryIII.....	39
Bioensayo.....	40
Perfil de plásmidos.....	42
Resistencia a los antibióticos.....	43
Determinación de la $\beta$ -exotoxina.....	44
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>LITERATURA REVISADA.....</b>	<b>49</b>
<b>APÉNDICE A.....</b>	<b>61</b>
<b>APÉNDICE B.....</b>	<b>65</b>

## **DEDICATORIA**

**A Dios Nuestro Señor**

**A la memoria de mis Padres: Felipe y Ma. de la Luz  
por la vida que me dieron y su inolvidable ejemplo.**

**A mis hermanos: Felipe, Lucila, Efraín, Leonel, Maricela y especialmente a Ana Ma  
por su cariño y apoyo en todo momento de mi vida.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitir mi desarrollo en la docencia e investigación, actividades que han dado sentido a mi vida.

Al Dr. Luis J. Galán Wong por su apoyo y consejos para enfocar la investigación en el control biológico de plagas de los granos almacenados

Al Dr. Benito Pereyra Alférez por su acertada dirección, su amistad y apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

A los integrantes del Comité de Revisión de Tesis: Dr. Carlos Hernández Luna, Dr. Hugo A. Luna O., Dra. Lilia H. Morales R. por la revisión y sus valiosos comentarios en la realización de esta investigación.

A la Facultad de Agronomía por su apoyo y consideración en el Plan de Formación de Profesores.

Al Dr. Emilio Olivares Sáenz Director de la Facultad de Agronomía por el apoyo brindado para la terminación de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Luis Cástulo, Magda, Cesar Alfonso, Artemisa, Alma y Adriana por su apoyo solidario, amistad y compañerismo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios Doctorales.

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Adulto y larva A: <i>Tribolium castaneum</i> ; B: <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .....	21
2	Amplificación del DNA de diferentes cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> ...	37
3	Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de los cristales proteicos de Bt tóxicos a coleópteros. Líneas 1 y 8 marcadores de talla molecular; 2, HD-73; 3, Btt; 4, GM-33; 5, C-9; 6, GM-80; 7, GM-83.....	39
4	Efecto detrimental de las cepas de Bt sobre el desarrollo de las larvas de <i>Tribolium castaneum</i> .....	40
5	Mortalidad de adultos de <i>Tribolium castaneum</i> por efecto de las cepas de Bt.....	41
6	Perfil de plásmidos de las cepas seleccionadas.....	42

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Talla molecular de las toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> , específicas contra coleópteros.....	10
2	Coleópteros susceptibles a <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	18
3	Variedades de <i>Bacillus thuringiensis</i> que atacan coleópteros.....	19
4	Productos comerciales a base de <i>Bacillus thuringiensis</i> usados para el control de coleópteros.....	20
5	Clasificación taxonómica del gorgojo castaño de la harina y el gorgojo aserrado de los granos.....	21
6	Características de los primers generales usados en la mezcla G.....	29
7	Características de los primers específicos.....	31
8	Productos y dosis probadas en la determinación de resistencia a los antibióticos.....	34
9	Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> positivas a <i>cryIII</i> .....	38
10	Mortalidad efectiva de adultos de <i>Tribolium castaneum</i> (Tc) y <i>Oryzaephilus surinamensis</i> (Os) por efecto de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	41
11	Patrón de resistencia de <i>Bacillus thuringiensis</i> a los antibióticos.....	43
12	Lecturas de absorbancia de los precipitados etanólicos.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados celsius
DNA	Acido desoxirribonucleico
cm	Centímetros
nm	Nanómetros
h	Hora(s)
min	Minuto(s)
seg	Segundo(s)
l	Litro(s)
ml	Mililitro(s)
µl	Microlitro(s)
g	Gramo(s)
mg	Miligramo(s)
µmoles	Micromoles
M	Concentración molar
N	Concentración normal
mM	Milimolar
µM	Micromolar
%	Por ciento
pH	Potencial hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
vs	Contra
et al	y otros
var.	Variedad
UV	Ultra violeta
v	Volts
mA	Miliamperes
kDa	Kilodaltones

## RESUMEN

Los granos almacenados, así como sus productos industrializados son atacados por plagas que determinan una merma en su calidad y en el precio. Estas plagas pertenecen a dos ordenes principalmente: Lepidoptera y Coleoptera. La palomilla de los cereales y el gorgojo castaño de la harina constituyen las principales plagas de los productos almacenados. El objetivo de este trabajo fue la selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* activas contra coleópteros como *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus surinamensis*. Para este efecto se utilizó PCR con el fin de identificar aquellas cepas de Bt que son portadoras del gen *cryIII* que codifica para la toxina contra coleópteros en general. Se ensayaron diferentes dietas para los insectos blanco, así mismo diseñamos un procedimiento para determinar bajo condiciones de laboratorio la toxicidad de las cepas sobre dichos insectos; el análisis de  $X^2$  permite sustentar nuestras observaciones. Los resultados muestran que las cepas GM-80, GM-83 y C-9 portan genes que pertenecen a la familia *cryIII* pero no corresponden con ninguno de los genes específicos descritos. La toxicidad máxima de las cepas GM-80 y GM-83 contra *T. castaneum* provocó una mortalidad del 33% en los dos casos y del 48% para *O. surinamensis* con la cepa C9. Estos resultados indican la presencia de cepas que pueden portar potencialmente nuevas proteínas Cry y que constituyen una alternativa potencial al control químico de plagas en granos almacenados y en harina, sin peligro al medio ambiente y para la salud humana.

## ABSTRACT

Stored grains, as well as their industrialized products, are attacked by plagues that determine a loss in quality and price. These plagues belong to two kinds mainly: Lepidoptera and Coleoptera. Cereal moth and flour's red weevil constitute the most common plagues of stored products. The purpose of this work was the selection and characterization of strains of *Bacillus thuringiensis* active against coleopterans as the *Tribolium castaneum* and *Oryzaephilus surinamensis*. For this purpose, PCR was used to identify those Bt strains that carry the *cryIII* gene that codifies toxins against coleopters in general. Results show that strains GM-80, GM-83 and C-9 carry genes that belong to the *cryIII* family, but don't belong to any of the specific genes described. The maximum toxicity of strains against targeted insects of this investigation caused a mortality of 33% for *T. castaneum* and 48% for *O. surinamensis*. These results show the presence of strains that can carry new Cry proteins, and that constitute a potential alternative for chemical plague control in stored grains and in flour without harm to environment and human health.



## INTRODUCCION

A pesar de advertir los problemas asociados al uso creciente de insecticidas, pocos materiales están disponibles para el manejo de plagas en los granos almacenados. Esto conlleva a la necesidad de desarrollar programas de manejo integrado de plagas basados en la biología y la ecología que exploten el comportamiento y la fisiología del insecto.

Por otra parte, la producción de granos tiene como fin primordial mayor rendimiento y mejor calidad de las cosechas; sin embargo, poca atención se ha dedicado a la protección de las cosechas en el almacén y a cuantificar la magnitud de las pérdidas. Se ha estimado que los insectos son la causa de la pérdida del 5 al 10% de la producción mundial de cereales en el almacén; en áreas tropicales, estas pérdidas alcanzan del 30 a 40% (Hall. 1970). Estadísticas sobre pérdidas de maíz en post-cosecha a nivel nacional, revelaron que, solo por insectos, se pierden del 10 al 25% (FAO. 1983).

Los granos en el almacén son atacados por plagas que destruyen el pericarpio de la semilla y su interior (insectos primarios) y por plagas oportunistas que se presentan después de que los granos han sido atacados (insectos secundarios).

Entre las plagas primarias se encuentran: *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica*, *Sitotroga cerealella*, *Prostephanus truncatus*, *Plodia interpunctella*; entre las plagas secundarias sobresalen *Tribolium castaneum* y *Tribolium confusum*. De estos últimos, *T. castaneum* es uno de los insectos secundarios mas abundantes y dañinos en los almacenes de los Estados de Nuevo León y Tamaulipas. Los granos que principalmente ataca este insecto son: maíz, sorgo, cebada, trigo y arroz. Aunque en menor proporción se presentan ataques sobre ajonjolí, cacahuate, harina de maíz y trigo. En esta última es donde ataca con mayor frecuencia. Estas plagas no se detectan con facilidad en las primeras fases de la infestación cuando la densidad de población es baja, sino hasta que aparecen los adultos (Leos. 1993).

Para el control de plagas en granos almacenados se han empleado productos químicos por su alta efectividad y rápida acción; sin embargo, la aparición de resistencia y el desequilibrio que provocan entre las plagas y sus enemigos naturales, así como la contaminación de aguas, suelo y aire, dirigen la atención hacia el desarrollo y empleo de bioinsecticidas.

Por más de 30 años el microorganismo más utilizado en el control de insectos ha sido *Bacillus thuringiensis* (Bt). Los bioinsecticidas a base de Bt cubren el 90 - 95 % del mercado mundial (Feitelson. *et al.* 1992). Se estimó la demanda del país de Bt en 182 ton/año para cultivos como maíz, trigo, sorgo y ajonjolí, con un precio de \$ 4,550,000 dólares (Quintero. 1997).

Bt se ha utilizado contra lepidópteros, dípteros, ácaros y coleópteros en general. En 1983 se aislaron las subespecies *tenebrionis* y *san diego* para el control de coleópteros como *Tenebrio molitor* y *Leptinotarsa decemlineata* en cultivos de papa y tomate principalmente, aunque existen muchos tipos de insectos plaga que no son controlados por las formulaciones disponibles, esto sugiere que la investigación sobre Bt deberá ser dirigida hacia 1) ampliar el espectro de acción a través del análisis de grandes colecciones de cepas, 2) elucidar el modo de acción de la toxina y 3) la expresión de los genes *cry* en nuevos sistemas. Así con la ingeniería genética y la biología molecular se cuenta con herramientas que permiten con relativa rapidez detectar genes y sus productos en un gran número de cepas.

Por estas razones se propone la búsqueda y aislamiento de cepas de Bt útiles en el control de coleópteros plaga de granos almacenados: *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus Surinamensis*.

### **Importancia:**

El control de coleópteros como *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus surinamensis* con bioinsecticidas a base de microorganismos entomopatógenos, permitirá proteger la producción y la calidad de los granos almacenados así como sus productos industrializados, sin el menor riesgo contaminante para el ambiente ni para la entomofauna benéfica, así como para la salud humana.

Las investigaciones realizadas muestran que existen cepas de *Bacillus thuringiensis* contra coleópteros. En el caso de granos almacenados *T. Castaneum* y *O. surinamensis* son plagas importantes cuya mortalidad se atribuye en forma natural al ataque por microorganismos o bien por insecticidas químicos. Estas consideraciones permiten emitir la siguiente

### **Hipótesis:**

Es posible encontrar, aislar, seleccionar y caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas contra *T. castaneum* y *O. surinamensis* en granos almacenados.

### **Objetivo general:**

Seleccionar y caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas contra *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus surinamensis* en granos almacenados

### **Objetivos específicos:**

- Aislar cepas nativas de Bt para controlar *T. castaneum* y *O. surinamensis* en granos almacenados.
- Identificar aquellas cepas de la Colección Internacional de Bt que poseen actividad contra *T. castaneum* y *O. surinamensis*
- Identificar él o los genes que codifican para los productos tóxicos contra *T. castaneum* y *O. surinamensis*.

## **ANTECEDENTES**

Las condiciones físicas del ambiente de almacén propician el desarrollo de poblaciones de insectos que se alimentan de granos o de sus productos industrializados, que se transforman en plaga al causar daños económicos al hombre. Si bien un manejo eficiente de almacén disminuye (y en ocasiones evita) las pérdidas ocasionadas por dichas plagas, es práctica común la aplicación de productos químicos como profilácticos o agentes de control.

La creciente concientización acerca de los problemas toxicológicos y ecológicos que ha causado el uso y abuso que los plaguicidas traen consigo, ha estimulado el estudio de alternativas viables como el control físico y biológico, incluyendo también las posibles combinaciones entre ellos.

### **El control biológico de insectos**

El control biológico de insectos se refiere al empleo de un organismo (ácaro, insecto, hongo, bacteria, protozooario o virus), incluso algunos productos o partes de ellos para controlar la población de otro (insecto plaga, ácaro o mala hierba).

En este sentido, el control biológico se ha utilizado en productos almacenados por diferentes causas: una de ellas es que la disciplina de entomología de granos almacenados se desarrolló para la protección de productos depositados en bodegas grandes y silos. De tal suerte que, la tolerancia para la presencia de insectos de cualquier tipo (plagas o insectos benéficos) es muy baja y aún más la fumigación resulta un método muy eficiente para el control. Así la investigación se orientó simplemente a la detección de bajos niveles poblacionales de plagas y su eliminación (Ríos-Ibarra. 1992)

Otro obstáculo para el uso del control biológico es la existencia de reglamentos para la adición de contaminantes de todo tipo (incluyendo enemigos naturales) a productos almacenados. Es interesante señalar que algunos de estos reglamentos fueron modificados recientemente en los

Estados Unidos para permitir el uso de algunos enemigos naturales específicos como ácaros depredadores que penetran fácilmente en los espacios entre granos y además se dispersan como pasajeros sobre el cuerpo de sus víctimas, o bien insectos que parasitan a otros insectos.

Es importante señalar que el hecho de observar la presencia de un enemigo natural no significa que el insecto es efectivo como agente de control biológico.

Una forma de control biológico que es prometedor para el manejo de plagas de productos almacenados es el uso de microorganismos patógenos a los insectos como virus, bacterias protozoarios y hongos. Estos microorganismos se utilizan de manera similar a los insecticidas sintéticos (es decir que son aplicados al producto almacenado como tratamiento preventivo) normalmente en forma de polvo seco. Algunos productos apropiados pueden ocasionar una alta mortalidad de la plaga sin matar enemigos naturales y sin dejar residuos tóxicos a mamíferos incluyendo humanos (Markham. 1992).

Se han encontrado más de 1,500 especies de microorganismos entomopatógenos con potencial en control microbiano de poblaciones de insectos plaga: agrícolas, forestales, ornamentales y salud. La mayoría de estas especies son poco conocidas, mientras que algunas como *Bacillus thuringiensis* (Bt) y sus serotipos se han estudiado detalladamente. Entre estas especies se hallan diferentes tipos de microorganismos. Esta gama incluye alrededor de 750 especies de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y casi 100 especies aisladas de insectos (Badii. 1993).

## **Los bioinsecticidas en el control biológico de insectos**

Las ventajas que ofrecen los bioinsecticidas microbianos se han discutido ampliamente entre ellas esta la resistencia casi nula ofrecida por los insectos a sus aplicaciones, ausencia de toxicidad para plantas, animales, humanos, así como a otros insectos no blanco, en consecuencia no contaminan el medio ambiente y especificidad para el insecto blanco. Además de que la producción de bioinsecticidas no depende de una sola materia prima para su producción.

Por otra parte su efecto no es tan rápido como el de los insecticidas químicos, son demasiado selectivos para eliminar un insecto y su costo se considera intermedio (Galán-Wong, 1993)

### ***Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico de insectos**

Entre 1951 y 1956 aparecen diferentes publicaciones que estimulan el uso y la explotación comercial de Bt como un agente de control microbiano contra algunas plagas de lepidópteros.

Dulmage en 1968, recuperó un potente aislado de Bt, el cual denominó HD-1, que resultó de 20 a 200 veces más potente que todas las cepas conocidas para el control de lepidópteros y es actualmente la base comercial de este tipo de productos a nivel industrial.

El control de coleópteros con bioinsecticidas prácticamente inició en 1983 cuando Krieg y col. aislaron una cepa de Bt a partir de *Tenebrio molitor*, la cual produce un cristal paraesporal de forma cuadrangular y contorno liso. De acuerdo a sus características bioquímicas corresponde a una subespecie nueva que fue denominada *tenebrionis* y es activa contra larvas de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae).

Hernstadt y col, (1986) aislaron una nueva cepa con actividad tóxica para coleópteros, este nuevo aislado se designó como Bt var. *san diego*, presenta un cristal plano y de forma rectangular.

Las variedades *san diego* y *tenebrionis* de Bt constituyen las dos patentes que existen para el control de coleópteros como *L. decemlineata* y *Diabrotica sp.* Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes acerca del control de coleópteros en granos almacenados a través de Bt, especialmente de *Tribolium castaneum*. En este trabajo se reporta el uso de *Bacillus thuringiensis* para el control de este insecto en granos almacenados o en productos alimenticios industrializados, principalmente harina de trigo.

## **Caracterización de Bt**

Bt, es una bacteria del suelo Gram positiva, aeróbica y esporulada, con flagelos peritricos, que produce inclusiones cristalinas de naturaleza proteica durante la fase de esporulación. De acuerdo a sus características bioquímicas Bt es idéntico a *Bacillus cereus*, con la diferencia que aquel produce cristal. Las primeras clasificaciones se dieron en base al antígeno H (flagelar), se reportaron 45 serotipos que distinguen a 45 serovarietades (Lecadet *et al.*, 1994)

Dichas inclusiones son proteínas llamadas  $\delta$ -endotoxinas; con actividad insecticida contra larvas de lepidópteros, dípteros, ácaros y coleópteros, así como para nemátodos.

La presencia del cristal, los antígenos H específicos (excepto para la cepa finitimus) y las propiedades entomopatógenas son los que distinguen a *Bacillus thuringiensis* de *B. cereus*, así todas las cepas cristalíferas se designaron como variedades de Bt (De Barjac y Bonefoi. 1972)

## **Clasificación de las toxinas de Bt**

Bt se caracteriza por producir una gran variedad de toxinas con diversas propiedades. Siete de ellas están descritas: La fosfolipasa C (conocida como  $\alpha$ -exotoxina); una toxina termoestable ( $\beta$ -exotoxina); una enzima no identificada que puede no ser tóxica ( $\tau$ -exotoxina); el cristal proteico paraesporal ( $\delta$ -endotoxina) que es el que posee actividad tóxica contra larvas de varios órdenes de insectos y algunos otros organismos, tales como nemátodos y protozoarios; una toxina lábil; una toxina soluble en agua aislada de una formulación comercial y una exotoxina conocida como factor ratón (Faust *et al.*, 1982).

De todos estos compuestos tóxicos, la  $\delta$ -endotoxina posee grandes atributos por su alta especificidad y nula residualidad. La  $\delta$ -endotoxina es sintetizada como protoxina y forma cristales paraesporales, los cuales pueden variar de forma y talla molecular (Faust *et al.*, 1982).

Hofte y Whiteley (1989) clasificaron los genes del cristal proteico de Bt con el criterio del espectro insecticida y la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Distinguieron 14 genes que codifican proteínas activas contra lepidópteros (*cryI*), lepidópteros y dípteros (*cryII*), coleópteros (*cryIII*) o dípteros (*cryIV*). Demostraron, además que todas las proteínas se caracterizan por una alta especificidad hacia el insecto hospedero.

Una nueva nomenclatura es propuesta por Crickmore y col. (1998) basada en el agrupamiento jerárquico de las secuencias de aminoácidos idénticos, donde los números romanos se intercambiaron por números arábigos en el primer rango, para el mejor acomodo del gran numero de nuevas secuencias esperadas. En esa propuesta 133 cristales proteicos estan agrupados en 24 clases primarias sistemáticamente arregladas.

Para no alterar el texto original de los articulos aquí citados, se continuará redactando según la clasificación propuesta por Hofte y Whiteley (1989).

Los genes *cryIII* codifican para proteínas específicas contra coleópteros, estas proteínas se encuentran en forma de cristales romboidales. En la Tabla 1 se muestran cuatro grupos de proteínas tipo CryIII que se han reportado.

**Tabla 1.** Talla molecular de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*, específicas contra coleópteros.

Toxina	Talla molecular (kDa)
CryIIIA ó Cry3Aa	73.100
CryIIIB ó Cry3Ba2	74.237
CryIIIB2A ó Cry3Ba1	74.393
CryIIIC ó Cry 7Aa	129.400
CryIIID ó Cry3Ca	73.300

Llama la atención la talla molecular de la proteína CryIIIC; sin embargo, la fracción tóxica que se libera después de la proteólisis es de 66 kDa. Un fragmento de la proteína Cry IB de aproximadamente 65 kDa es el péptido más pequeño que retiene bioactividad contra larvas de



lepidópteros y coleópteros (Bradley *et al.*, 1995). Los genes de las proteínas CryIII presentan cierta homología con los genes *cryI* y *cryIV* en el dominio tóxico (Hofte y Whiteley 1989 ).

Una nueva subclase de genes: *cryIIIC*, se caracterizan por producir un cristal proteico de forma bipiramidal, de 129 kDa con un fragmento nuclear resistente a la tripsina de 72 kDa. La secuencia de aminoácidos del fragmento tóxico tiene 37, 32 y 33% de homología con las toxinas de CryIIIA, CryIIIB y CryIIID respectivamente. Es interesante resaltar que los aminoácidos hacia el carboxilo terminal mostraron del 41 al 48% de similitud con aquellas secuencias de las otras proteínas cristalinas. Naturalmente los cristales de CryIIIC no son tóxicos, a menos después de que se solubilizan *in vitro* y se activen por proteasas (Lambert *et al.*, 1992).

CryIIIB2 muestra significativamente similaridad estructural a CryIIIA, el dominio 1 del péptido CryIIIB2 es suficiente para la formación de canales iónicos y para promover el eflujo de iones en el intestino medio de *Leptinotarsa decemlineata* y *Diabrotica undecimpunctata* (Von Tersch *et al.*, 1994 ).

Lambert y col. (1992) describen la secuencia nucleotídica del gen *cryIIID* que codifica un nuevo cristal protéico activo contra coleópteros a partir de la cepa BT1109P de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; ellos señalan que el gen descrito es mucho más activo contra el escarabajo de la papa de Colorado que otros *cryIII*.

## **Estructura molecular de la $\delta$ -endotoxina**

La estructura de la  $\delta$ -endotoxina CryIIIA tóxica para coleópteros, la determinaron Li y col. (1991) a una resolución de 2.5 Å; encontrando que la toxina comprende tres dominios que son a partir del amino terminal: un conjunto de siete hélices, un dominio de tres laminas y un beta sandwich. El núcleo de la molécula que rodea todos los tres dominios es un conjunto de segmentos conservados de la  $\delta$ -endotoxina activa. El conjunto de largas, hidrofóbicas y anfipáticas hélices esta equipado para la formación del poro en la membrana del insecto y las

regiones del dominio de las tres laminas son probablemente los responsables de enlace al receptor. Esto proporciona la base para que se realicen numerosos estudios sobre la expresión, secuencia y modo de acción de la misma.

Es la estructura molecular de la  $\delta$ -endotoxina CryIIIa la que permite asumir que las estructuras proteicas de las toxinas Cry son similares, debido a que poseen cinco bloques de secuencias altamente conservadas. La alineación de las secuencias de las diferentes toxinas de Bt revelan que estos bloques constituyen el núcleo de CryIIIa. La proteína consta de tres dominios estructurales: el dominio I parece estar involucrado en la inserción hacia la membrana y la formación del poro; el dominio II está implicado en la especificidad y el dominio III en especificidad y conformación estructural (Li *et al.*, 1990 ).

La organización proteica de los cristales insecticidas de Bt revela que son semejantes en su estructura primaria. La región hacia el amino terminal es rica en  $\alpha$ -hélices y el carboxilo terminal está formado por laminas  $\beta$ -plegadas, sin estructura definida (Bietlot *et al.*, 1989 ; Choma *et al.*, 1990 ).

### **Modo de acción de la $\delta$ -endotoxina**

Para que las toxinas de Bt ejerzan su acción letal, es necesario que la larva ingiera la mezcla espora-cristal y una vez que ha ocurrido esto, los síntomas visibles son: la larva cesa de alimentarse, regurgita el contenido intestinal, se mueve lentamente, sufre parálisis del tracto digestivo, parálisis total y finalmente, la muerte (Bai *et al.*, 1993).

Si bien las  $\delta$ -endotoxinas pueden atacar a diversos órdenes de insectos, éstas actúan de manera muy similar. Para que se lleve a cabo su acción letal, es preciso que se realicen varios eventos bioquímicos, donde sobresalen los siguientes: a) ingestión y solubilización del cristal; b) procesamiento de la protoxina en el intestino medio; c) unión de la toxina activa al receptor y d) formación de un poro, lo que conduce a la lisis celular.

**Solubilización:** Los cristales paraesporales están conformados por más de mil unidades de protoxina, las cuales se solubilizan y activan en el intestino del insecto, este proceso requiere de un pH alcalino (lepidópteros), que es esencial para solubilizar la mayoría de las toxinas de Bt, generalmente insolubles a valores de pH menores de 9.5 (Knowles y Dow, 1993).

Se determinó que los cristales nativos de la subespecie *san diego* se disuelven a pH 10 o mayor y abajo de 4. En pH ácido la tasa de solubilización fue substancialmente más lenta que a pH alcalino. La toxicidad fue más alta para la toxina soluble que para la toxina cristalizada, pero virtualmente idéntica en soluciones ácidas o alcalinas. La solubilización en medio ácido es significativa debido a la acidez del intestino medio de coleópteros susceptibles (Koller, Bauer y Hollingworth, 1992).

La adecuada solubilización de las proteínas Cry juega un papel fundamental en la liberación de los diversos tipos de proteínas y el procesamiento proteolítico para generar el fragmento tóxico.

Estudios *in vitro*, han demostrado que la solubilización de los cristales depende de la composición de las proteínas que lo conforman. En Bt *aizawai* (HD-133), el cristal esta formado por tres toxinas (Cry1Ab, Cry1C y Cry1D) donde la presencia de Cry1Ab da como resultado un cristal mas soluble, el cual incrementó la toxicidad hacia larvas de *S. frugiperda*, pero no para *P. interpunctella*, donde se observó un efecto contrario (Aronson *et al.* , 1991)

Otro factor que puede influir en la solubilización de los cristales, se ha relacionado con el contenido de enlaces disulfuro, este efecto solo se ha observado en algunas proteínas Cry que carecen de actividad insecticida y no se ha generalizado hacia proteínas Cry toxicas (Du *et al.* , 1994)

Por otra parte, se ha visto que la solubilización podría ser un factor determinante en el probable desarrollo de resistencia, tal y como se ha sugerido para *P. interpunctella* (Schnepf *et al.*, 1998)

En otros insectos, como coleópteros y dípteros, este efecto no se ha demostrado, ya que el conocimiento básico es muy limitado. En *L. decemlineata* se reportó que para que Cry3A pueda ser solubilizada es necesaria una hidrólisis previa con proteasas tipo quimiotripsina (Carrol *et al.*, 1997).

**Activación:** Una vez solubilizadas, las protoxinas son procesadas por las proteasas presentes en el intestino de la larva. En las proteínas Cry1 el procesamiento proteolítico remueve los primeros 28-29 aminoácidos del extremo amino terminal, en el extremo carboxilo, el procesamiento es más intenso y extenso ya que se remueven los últimos 600 aminoácidos en secciones de 10 kDa, originando un fragmento de 55-65 kDa resistente a posteriores digestiones (Chestukina *et al.*, 1990; Choma *et al.*, 1991).

**Unión al receptor:** Posterior a la activación, el fragmento tóxico penetra la membrana peritrófica y se une a sitios específicos localizados en las microvellosidades de la membrana apical de las células columnares. Esta unión es la etapa determinante de la especificidad de las toxinas Cry. Hofmann (1989) y Van Rie (1989), mediante estudios de unión y competencia con 1Aa, 1C y 1E, demostraron correlación entre la afinidad de la toxina y la actividad insecticida, concluyendo que una alta afinidad era garantía de toxicidad, contrastando con una baja o nula unión en insectos no susceptibles.

En ensayos similares las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, indican que las diferencias en toxicidad son debidas a la afinidad por un sitio de unión y también a la concentración de éstos. Los resultados demuestran que para *M. sexta*, que es igualmente sensible a las tres toxinas, y para *H. virescens*, que presenta diferente sensibilidad, las constantes de unión son semejantes, pero la concentración de sitios para cada toxina son significativamente diferentes (Van Rie *et al.*, 1990).

No obstante, la unión es requisito para la toxicidad, ésta no siempre es dependiente del grado de afinidad de la toxina por el receptor, tal y como se demostró con las toxinas HD1-9 y HD-73 en *L. dispar*, donde se encontró una correlación inversa entre la unión al receptor y la toxicidad. Los valores de unión fueron muy semejantes, pero HD1-9, mostró constantes de

disociación casi 20 veces mayor, a pesar de ser 400 veces más toxica que HD-73 (Wolfersberger, 1990).

Otro ejemplo raro de ausencia de correlación entre la afinidad y la actividad insecticida, fue reportado por Liang y Dean (1995), quienes evaluaron las constantes de afinidad y disociación de Cry1Aa, Cry1Ab, y Cry1Ac, con vesículas del intestino medio de *L. dispar*, confirmando que la afinidad de Cry1Ab no esta directamente relacionada con la actividad de la toxina y encontraron una correlación directa entre el rango de unión y toxicidad.

La unión toxina-receptor involucra dos pasos secuenciales: a) unión reversible, esto es la unión entre la toxina y el receptor y b) unión irreversible, exclusivamente asociada con la inserción de la toxina en la membrana apical (Hofmann *et al.*, 1988).

Se han caracterizado e identificado bioquímicamente algunos de los receptores como:

**a). Aminopeptidasa N (APN):** Generalmente las APN son una familia de proteínas localizadas, en células del tracto digestivo. Existe evidencia que sugiere su participación como receptores para algunos hongos y virus, como coronavirus y herpesvirus (Knight *et al.*, 1995). Las APN se han localizado en el intestino medio de diversos lepidópteros y se ha demostrado que unen algunas proteínas Cry. Algunas de estas APNs se han clonado y deducida la secuencia de aminoácidos. (Knight *et al.*, 1995; Sanchis y Ellar, 1994).

**b). Caderina:** La proteína receptora para Cry1Ab (BT-R<sub>1</sub>), fue el primer receptor que se clonó y expresó a partir de un cDNA de *M. sexta*, este receptor mostró un 30 - 60% de similitud y un 20-40% de identidad a los miembros de la familia de las caderinas, que son glicoproteínas transmembranales encargadas de mediar la agregación celular, dependiente de calcio; pueden estar involucradas en el transporte membranar, posiblemente esta función es similar al transporte de péptidos en las proteínas tipo caderinas de humanos (Vadlamudi *et al.*, 1995).

Existen reportes donde se sugiere la participación de otro tipo de proteínas, específicamente una fosfatasa de 65 kDa, la cual unió a CryIAc en *M. sexta* (Sangadala *et al.*, 1994). Sin embargo, no se ha demostrado actividad similar en otros insectos.

**Formación de poro:** Posterior a la unión al receptor, la toxina forma un poro o canal iónico. Sin embargo, la naturaleza de éstos es aún controversial, se han descrito como poros iónicos que no son específicos para algunos iones en particular y alternativamente, como canales específicos de iones, que interrumpen el potencial de membrana, pero no necesariamente lisa las células (Schnepf *et al.*, 1998).

De acuerdo a la estructura de las  $\delta$ -endotoxinas, se han propuesto dos modelos que explican su inserción en la membrana plasmática de las células columnares: Modelo del cortaplumas, Hodgman y Ellar (1990), propusieron a las hélices  $\alpha$  5 y  $\alpha$  6 como las encargadas de insertarse en la membrana y formar poros. Por las características anfipáticas de las  $\alpha$  hélices,  $\alpha$  5 y  $\alpha$  6, se encuentran al extremo del dominio I, del lado opuesto de la membrana y por lo tanto, podrían saltar del dominio I, parecido a un cortaplumas abierto. El resto del dominio I, no requiere un rearrreglo posterior aunque  $\alpha$  4, probablemente podría girar hacia el lado de  $\alpha$  3.

Modelo del paraguas, un par de  $\alpha$  hélices ( $\alpha$  6 y  $\alpha$  7 ó  $\alpha$  4 y  $\alpha$  5), permanecen del lado exterior del dominio I, hasta insertarse dentro de la membrana, mientras el resto de las hélices sufren un rearrreglo conformacional, quedando separadas en la superficie de la membrana, semejando la varilla de un paraguas. Recientemente se ha postulado que el par de  $\alpha$  hélices que se inserta en la membrana de forma antiparalela son  $\alpha$  4 y  $\alpha$  5, mientras  $\alpha$  7 sirve como un monitoreador de la inserción para iniciar el rearrreglo estructural del dominio formador del poro (Gaitz *et al.*, 1998).

En ambos modelos la inserción de parte del dominio I, puede estar acompañada de la formación de oligómeros de varias moléculas de toxina, que originarán los poros con un canal central acuoso.

La actividad insecticida del cristal proteico de *Bt thuringiensis* contra larvas de coleópteros se incrementó por la solubilización de la toxina y al truncarla con tripsina antes de administrarse al insecto. Estos resultados sugieren que para algunos insectos la especificidad aparente del hospedero de la proteína puede depender de las diferencias en el ambiente del intestino medio y de las diferencias en la interacción toxina-receptor (Bradley *et al.*, 1995).

Se ha encontrado que en algunos casos no es suficiente que la toxina se una al receptor para que mate al insecto, esto sugiere que existen otros factores involucrados en el mecanismo de acción de la toxina de Bt (Wolfersberger, 1990).

Los receptores son diferentes en cada tipo de insecto, lo mismo que su número y la eficiencia de unión entre la toxina y el receptor. MacIntosh y col. (1991) en su estudio sobre la unión de las proteínas de Bt a *Heliothis virescens*, concluyeron que existe diferente especificidad de las proteínas hacia el receptor y que las cepas tóxicas a *H. virescens* (CryIA) no compiten por el receptor con las producidas por CryIIIa que son específicas para coleópteros. Encontrando que en lepidópteros y coleópteros los cambios histopatológicos incluyeron el rompimiento de la vellosidad intestinal, vacuolización del citoplasma, hipertrofia de las células epiteliales y desintegración de la célula. Después de la ingestión del cristal por las larvas, las proteínas del cristal insecticida se acumularon en la membrana peritrófica. Sin embargo la unión a dicha membrana no correlaciona con la toxicidad puesto que la proteína tóxica a coleópteros también se retiene en la membrana peritrófica de lepidópteros y viceversa (Bravo *et al.*, 1992).

Con *Bt san diego* trabajaron Bauer y Pankratz (1992) para controlar el escarabajo de la hoja del algodón *Chrysomela scripta* con el cristal de la  $\delta$ -endotoxina y esporas vivas. Su investigación a nivel ultraestructura la realizaron en el intestino medio de células epiteliales de dicho insecto. Los resultados indican que los efectos se presentaron hasta dos horas después del tratamiento; las células presentaban grandes espacios citoplásmicos, expansión del laberinto basal, rompimiento del retículo endoplásmico rugoso y desplazamiento del núcleo apical. Después de tres horas el daño se incrementó.

## El control de coleópteros a través de Bt

Uno de los coleópteros que mayor atención han recibido en el control biológico de insectos es el escarabajo de la papa de Colorado *Leptinotarsa decemlineata* gran defoliador de ese cultivo y del tomate. La literatura muestra que las plagas de granos almacenados entre ellas *Tribolium confusum* y *T. castaneum* actualmente son blanco de la biotecnología de insecticidas. En la Tabla 2 se muestran algunos de los coleópteros susceptibles a *Bacillus thuringiensis*.

**Tabla 2 . Coleópteros susceptibles a *Bacillus thuringiensis***

Insecto	Referencia
<i>Tribolium confusum</i>	Singh. 1979; Arthur, 1994
<i>Tribolium castaneum</i>	Singh. 1979
<i>Callosobruchus chinensis</i>	Singh. 1979
<i>Tenebrio molitor</i>	Chilcott. 1993
<i>Sitophilus oryzae</i>	Kramer. 1985
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Donovan. 1988; Mac Intosh. 1990; Rupar. 1991; Zehnder. 1992
<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	Rupar. 1991
<i>Plagiodera versicolora</i>	Bauer. 1992
<i>Chrysomela scripta</i> F.	Bauer y Pankratz. 1992
<i>Oxythyrea funesta</i>	Robert. 1994

En la búsqueda de nuevas cepas de Bt para controlar insectos se han utilizado técnicas moleculares para monitorear rápidamente grandes colecciones de microorganismos. Se ha demostrado que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta útil para este fin.

En este sentido, Carozzi y col. (1991) establecieron una metodología de análisis rápido para predecir la actividad insecticida de cepas de Bt a través de PCR. En el monitoreo se incluyeron iniciadores específicos (de 12 a 20 pb) para los genes *cryI*, *cryIII* y *cryIV*, que son



letales para lepidópteros, coleópteros y dípteros respectivamente. Ellos concluyen que la actividad insecticida predicha a través de PCR corresponde con aquella encontrada en los bioensayos y agregan que la PCR puede identificar cepas con patrones electroforéticos alterados que pueden contener potencialmente nuevos genes.

Por otra parte, el aislamiento de nuevas cepas de Bt del suelo, o bien de larvas o adultos enfermos o muertos en granos almacenados, ha permitido identificar subespecies de Bt capaces de controlar coleópteros. Se han descrito diferentes variedades de este bacilo con potencial para el control de insectos plaga. En la Tabla 3 se muestran las variedades de Bt identificadas para el control de coleópteros.

**Tabla 3 . Variedades de *Bacillus thuringiensis* que atacan coleópteros\***

Variedad o cepa	Referencia
<i>thuringiensis</i>	Singh, 1979
<i>aizawai</i>	Singh, 1979
<i>kurstaki</i>	Singh, 1979
<i>soto</i>	Singh, 1979
<i>tenebrionis</i>	Von Krieg <i>et al.</i> 1983
<i>san diego</i>	Herrstadt <i>et al.</i> 1986
<i>tholworthi</i>	Sick <i>et al.</i> 1990
cepa EG2838 y EG4961	Donovan, 1992
<i>morrisoni</i>	Rahardja, 1995

\* La referencia que se muestra corresponde al trabajo inicial donde se identificó la variedad o al artículo donde se utilizó.

Son las variedades *tenebrionis* y *san diego* las que constituyen la mayoría de los productos comerciales de Bt contra coleópteros y sobre las que se han realizado la mayor parte de los estudios. En la Tabla 4 se presentan los productos comerciales a base de Bt usados para el control de coleópteros, así como las compañías productoras y las cepas que constituyen el ingrediente activo.

**Tabla 4. Productos comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* usados para el control de coleópteros.**

Producto	Compañía Productora	Cepa/toxina de Bt
M-One	Mycogen	<i>san diego</i>
M-One plus	Mycogen	<i>san diego</i>
M-Trak	Mycogen	<i>tenebrionis</i>
Trident	Sandoz	<i>tenebrionis</i>
Novodor	Novo	<i>tenebrionis</i>
Diterra	Abbott	<i>Tenebrionis</i>

Chilcott y Wigley (1993) probaron la toxicidad de aislados de Bt en contra de *T. molitor* encontrando que la toxicidad fluctuó entre el 0 y 6 % contra el coleóptero y que los aislados activos contenían una proteína de 68 kDa. Por otra parte la aplicación de Bt (Dipel, 125 ppm en una capa superficial de 10 cm) para el control de *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum* y *Plodia interpunctella* resultó inadecuada para el control de estos insectos (Kramer *et al.*, 1985 ).

La aplicación de cuatro formulaciones de Bt (Dipel, Foil, M-Trak y Trident) sobre cacahuates mostró que después de 8 meses las poblaciones del escarabajo castaño de la harina, *Tribolium castaneum* no fueron significativamente diferentes de los controles no tratados (Arthur y Brown. 1994). Existen reportes (Cheng *et al.*, 1992; Sutton *et al.*, 1992 y Chen *et al.*, 1995); sobre el uso de plantas transgénicas que expresan genes de Bt para el control de coleópteros. Entre estas plantas se encuentra la papa, berenjena y nogal.

### **El gorgojo castaño de la harina y el gorgojo aserrado de los granos**

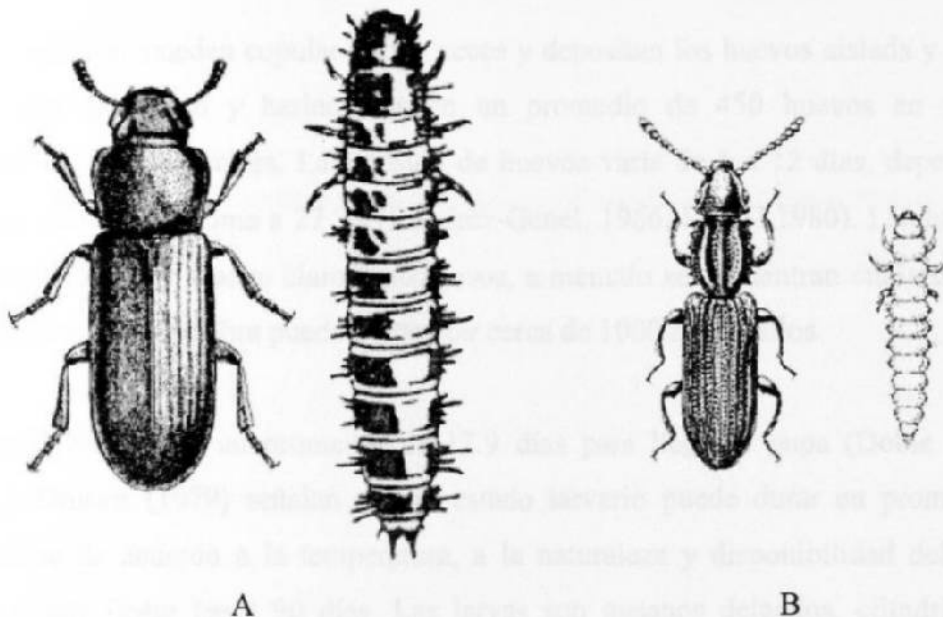
Una población de insectos no será entendida si no se conoce al individuo de una forma suficientemente amplia. Es muy importante conocer la biología y los hábitos de la plaga para poder explicar algunos fenómenos que se presentan en una población (Ríos-Ibarra. 1992). En la siguiente Tabla se presenta la clasificación taxonómica del gorgojo castaño de la harina y del gorgojo aserrado de los granos.

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica del gorgojo castaño de la harina y del gorgojo aserrado de los granos.

Phylum	Arthropoda	
Clase	Insecta	
Orden	Coleóptera	
Familia	Tenebrionidae	Silvanidae
Género	<i>Tribolium</i>	<i>Oryzaephilus</i>
Especie	<i>castaneum</i>	<i>surinamensis</i>

Es posible confundir a *Tribolium castaneum* con *Tribolium confusum*, los adultos de este último presentan las antenas gradualmente elongadas y terminadas en punta; las antenas del gorgojo castaño de la harina presentan los últimos tres segmentos abruptamente mas grandes. *T. confusum* no puede volar pero *T. castaneum* si lo hace.

En la Figura 1 se muestran el adulto y la larva de *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus surinamensis*.



**Figura 1.** Adulto y larva A: *Tribolium castaneum*; B: *Oryzaephilus surinamensis*

La presencia de estos insectos o fragmentos de ellos determina una mala calidad del producto y la consecuente penalización sobre el precio, en el mejor de los casos. La norma oficial

mexicana establece que en harinas la presencia de sustancias extrañas debe ser de menos de 50 fracciones de insectos y menos de 5g de excretas de roedor por cada diez kg.

### **El ciclo de vida de *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus surinamensis***

Ambos gorgojos presentan un ciclo de vida con diferentes fases de crecimiento: huevecillo, larva, pupa y adulto. El desarrollo, sobrevivencia y producción de huevecillos depende de una dieta adecuada y de las condiciones ambientales. Estos factores también determinan los sitios de apareamiento y de oviposición del insecto

El adulto de Tc es de 2.3 a 4.4 mm de largo, aplanado; color café castaño. La cabeza, el tórax y el abdomen son diferenciales, con antenas bien desarrolladas. Los adultos de *T. castaneum* pueden vivir cerca de 6 meses; Ramírez (1986) señala que puede ser hasta 18 meses.

Las hembras pueden copular varias veces y depositan los huevos aislada y libremente en las impurezas del grano y harinas; ponen un promedio de 450 huevos en varios meses, dependiendo de la temperatura. La eclosión de huevos varía de 5 a 12 días, dependiendo de la temperatura, siendo la óptima a 27 °C (Ramírez-Genel. 1966; SARH.1980). Los huevecillos son muy pequeños de color blanco claro y pegajosos, a menudo se encuentran cubiertos de harina o de otros alimentos. La hembra puede ovipositar cerca de 1000 huevecillos

Las larvas tardan un promedio de 12.9 días para llegar a pupa (Dobie *et al.*, 1991). Lindblad y Druben (1979) señalan que el estado larvario puede durar en promedio 35 días, prolongándose de acuerdo a la temperatura, a la naturaleza y disponibilidad del alimento, en ocasiones puede llegar hasta 90 días. Las larvas son gusanos delgados, cilíndricos, de color amarillo pálido; al completar su desarrollo miden 4.5 mm de largo. Los segmentos presentan pelos finos y en el segmento terminal poseen un urogomphi de dos cuernos dirigidos hacia arriba.

La pupa es desnuda, inicialmente blanca, tornándose gradualmente amarillenta; presenta en la superficie dorsal haces de pelos como en el caso de las larvas. En condiciones óptimas, el estado pupal tarda de 6 a 9 días para llegar a adulto.

Dobie y col. (1991) señalan que bajo condiciones físicas y de alimentación óptimas, el desarrollo de huevo a adulto es de aproximadamente 20 días.

Los adultos de *O. surinamensis* son de color café y miden alrededor de 2.5 mm de largo. Su cuerpo es plano y esto les facilita entrar entre las grietas de los alimentos empacados. El torax de este insecto presenta proyecciones aserradas a cada lado. Aunque cuenta con alas bien desarrolladas raramente vuela. Las larvas son de color blanco-amarillento, con la cabeza negra y tres pares de patas. La hembra puede ovipositar solo o en grupos cerca de 300 huevecillos, que eclosionan en 8 días. Después de 2 o 4 mudas (37 días aproximadamente) la larva esta completamente madura. La fase de pupa dura siete días. Bajo condiciones ideales el insecto puede completar su ciclo de vida en 25 a 30 días y se pueden presentar hasta seis generaciones por año.

### **Efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento del insecto**

Las preferencias de temperatura de los insectos son importantes debido a su incapacidad para regular la temperatura corporal, de tal forma que este factor ambiental determina el tiempo de desarrollo, la fecundidad y la tasa de crecimiento poblacional. Los adultos de *Tc* y *Os* prefieren temperaturas alrededor de los 30°C (Langer y Young, 1976). A esta temperatura el tiempo de desarrollo es corto, la tasa de fecundidad y de crecimiento poblacional son altas. Donahaye y col. (1996) encontraron temperaturas adecuadas de desarrollo a 35°C .

Se han encontrado diferencias en la temperatura que prefieren los adultos de *Tc* en función del sexo; las hembras son menos dinámicas y prefieren lugares mas frescos que los machos. El movimiento de los machos hacia lugares tibios se explica por su habilidad para

detectar el calor con el tercer segmento de sus antenas (Hagstrum *et al.*, 1998). Las bajas temperaturas también limitan el desarrollo del insecto, el adulto muere a 0°C y la pupa a -18°C.

El efecto de la humedad del grano lo han estudiado Fields y Korunic (2000) y encontraron que a medida que disminuye el contenido de humedad aumenta la mortalidad. El contenido de humedad en grano y harina donde se desarrolla mejor *Tc* y *Os* es del 12.5% (Rentería-Gutierrez *et al.*, 2000).

### **Efecto de los factores nutricionales sobre el crecimiento del insecto**

*T. castaneum* y *O. surinamensis* utiliza los aromas volátiles del grano para distinguir si los granos de los cereales almacenados están dañados mecánicamente o por otros insectos (Trematerra *et al.*, 2000). Pueden crecer en grano entero de trigo, hasta completar su ciclo de vida, sin embargo el crecimiento de la población es más alto cuando se cultivan en harina de trigo (Via. 1991).

Rentería-Gutierrez y col. (2000) encontraron que un número reducido de adultos de *T. castaneum* resultó cuando estos se criaron sobre grano entero, pero una alta densidad de adultos se presentó cuando estos se criaron en harina, incluso de diferentes variedades de trigo. También establecen que el contenido de proteína total y las características físicas no tuvieron una influencia significativa sobre el crecimiento poblacional de esta especie.

Cuando *Tc* se crió sobre muestras de harina procedentes de diferentes variedades de trigo comercial se encontró fuerte correlación entre el contenido total de almidón vs. el número de larvas y adultos. Hagstrum y col. (1998) han logrado mantener la cría de insectos por varias generaciones con una dieta a base de harina de trigo y 5% de levadura de cerveza a 36°C y 70% de humedad relativa.

## **La cría de *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus surinamensis***

Existen amplias descripciones acerca del equipo e infraestructura para cultivar Tc y Os (Via, 1991; Rentería-Gutierrez *et al.*, 2000; Trematerra *et al.*, 2000; Mohan *et al.*, 2002), sin embargo su diseño depende mas del ingenio y de la disponibilidad de recursos para establecer la cría.

Es importante que los insectos incluidos en los bioensayos sean de la misma edad. Esto permite atribuir las causas de muerte a una sola fuente de variación y descartar la muerte por otras causas. En este sentido también será posible cuantificar la mortalidad natural del insecto bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

## **Control de gorgojos en el almacén.**

Las estrategias de control de plagas de los granos almacenados en México, generalmente carecen de una consideración ecológica en sus planteamientos generales. Esta puede ser una de las razones por las que el uso de plaguicidas sintéticos, que aparentemente es la solución más rápida y eficiente a un problema de plagas, ha sido el único método utilizado en el control de insectos de almacén.

La solución rápida y eficiente de los problemas insectiles , por ejemplo, lograda con la aplicación adecuada de plaguicidas, se ha convertido en la actualidad en una solución problemática, debido a la detección de resistencia de los insectos a los plaguicidas, y al reciente interés en la no contaminación de los alimentos y el ambiente.

Ríos-Ibarra en 1992 propone un enfoque ecológico en los estudios entomológicos de los granos almacenados para el manejo integrado de las plagas de almacén. Dichos estudios deberán considerar el almacén como un sistema ecológico, donde el conocimiento de la biología y hábitos de la plaga, épocas de más actividad, así como los cambios poblacionales de insectos permitirá desarrollar estrategias de control mas eficientes, sin peligro a la salud pública o ambiental.

Reconoce además que en México, la falta de este enfoque ha llevado a la casi exclusiva dependencia del control químico para solucionar los problemas entomológicos del almacén.

### **Control químico**

Los productos químicos gaseosos (fumigantes) que se usan con mas frecuencia son el bromuro de metilo y fostoxin, preferidos por su alta efectividad y poca residualidad en el control de plagas de granos almacenados y harinas. Sin embargo, el riesgo que implican hacia el medio ambiente y la dificultad para manejarlos, determina que se busquen alternativas seguras y ecológicas en el control de insectos (EPA, 1997).

### **Control fisico**

El control fisico de gorgojos en el almacén se ha intentado a través de alta y baja temperatura, de 26 a 50° C y de 0 a -18° C respectivamente. La mayor efectividad se encontró a 50° C con una mortalidad del 100% (Dowdy, 1998; Fields y Korunic, 1999). El cambio de 35 a 50° C permitió disminuir la tasa de fecundidad y el crecimiento poblacional. Este tratamiento surge como una alternativa segura al uso de fumigantes en los molinos de trigo.

Por otra parte, el adulto de *Tc* fue mas sensible a las bajas temperaturas que las pupas del mismo insecto. Estas murieron a -18° C (Donahaye *et al.*, 1995).

También se ha estudiado el efecto de la temperatura combinado con la presencia de tierras diatomáceas, con la finalidad de incrementar la actividad del insecto y así causar daños físicos sobre el cuerpo del bicho con la diatomita. Esta práctica se ha evaluado en granos almacenados por Fields y Korunic, en 1999.



## **Resistencia a insecticidas**

Whalon y col. (1993) reportaron por primera vez la resistencia a la  $\delta$ -endotoxina específica para coleópteros CryIIIA de *Bt san diego* o *tenebrionis*. Sus resultados indican que después de 12 generaciones de selección, la cepa seleccionada del escarabajo de la papa de Colorado fue 59 veces más resistente que las no seleccionadas y de 24 a 35 veces más resistentes que otras cepas resistentes o susceptibles al insecticida. También, se mostró que la resistencia a la  $\delta$ -endotoxina se confiere por genes de dominancia incompleta. En cuanto a la estabilidad de la resistencia, después de que se removió la presión de selección, el nivel de resistencia de la colonia seleccionada disminuyó después de cinco generaciones y se mantuvo constante por más de 12 generaciones (Rahardja y Whalon, 1995).

Estos antecedentes muestran que el control de gorgojos en el almacén como Tc y Os a través de medios biológicos, constituye un área de oportunidad para la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*, permitiendo productos alimenticios de mejor calidad y de mayor vida de anaquel sin ningún riesgo ecológico.

## MATERIALES Y METODOS

Las cepas de Bt usadas en este estudio provinieron de dos fuentes a) de la Colección Internacional de *Bacillus thuringiensis* que posee el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, previamente seleccionadas por la región de procedencia y b) Otras cepas fueron aisladas de granos almacenados y de larvas o adultos muertos obtenidos de las instalaciones de los Almacenes Nacionales de Deposito (ANDSA) localizadas en San Nicolás de los Garza y Cadereyta Jiménez N.L. Las muestras colectadas se transportarán al laboratorio en frascos de vidrio estériles.

### 1. Aislamiento de las cepas contra coleópteros

Las muestras de granos y suelo (1.0 g) fueron homogenizadas y colocadas en 10 ml de agua estéril e incubadas 30 min/ 60°C. La suspensión fue enfriada a temperatura ambiente, sembrada en agar nutritivo e incubadas 48-72 h/ 28 °C.

Las colonias con morfología típica, fueron seleccionadas y sembradas por separado en cajas de Petri por duplicado. A estas colonias se les realizó tinción simple para buscar el cristal característico de *Bacillus thuringiensis*.

### 2. Identificación de la cepa

Para identificar las cepas sospechosas (por inspección al microscopio del cristal característico), se utilizó PCR según la metodología descrita por Ceron y col. (1995).

Las cepas de Bt se cultivaron en cajas de Petri durante 12-16 h, se tomó una azada de una colonia determinada y se hirvió durante 10 min. en 100 µl de H<sub>2</sub>O para lisar las células. Se

centrifugó durante 10 seg. a 10,000 rpm y se tomaron 15 µl del sobrenadante para desarrollar la PCR. Las condiciones de esta reacción fueron las siguientes: MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Buffer 1X, 0.2 mM de cada desoxinucleosidos trifosfatados, 0.3 µM de cada primer y 0.5 a 2.5 U de Taq polimeraza en un volumen total de 50 µl.

Se preparó la mezcla G que contenía los cuatro primers generales para identificar los genes *cryI* y *cryIII* (CJI-1, CJI-2, CJIII20 y CJIII21). La secuencia de cada primer y la talla molecular de los productos de PCR esperados se muestran en la Tabla 6. Las cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Btt), la GM-33 y la HD73 se utilizaron como controles para probar los juegos de primers. La cepa Btt porta el gen *cryIIIA*, la GM33 contiene *cryIIIC* y la HD73 a *cryIA*.

**Tabla 6.** Características de los primers generales usados en la mezcla G.

Primer	Secuencia	Gen reconocido	Talla del producto (pb)
CJI-1	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA	<i>cryI</i>	272
CJI-2	5'TATCGGTTTCTGGGAAGTA	<i>cryI</i>	
CJIII20	5'TTAACCGTTTTCGCAGAGA	<i>cryIII</i>	709
CJIII21	5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG	<i>cryIII</i>	

La amplificación del DNA se realizó en un termociclador modelo Perkin-Elmer AmpGen 2400. La desnaturalización se realizó en un ciclo de 2 min. a 95 °C, seguida por 30 ciclos que consistieron de 1 min a 95°C para la desnaturalización, 1 min. a 48°C para el alineamiento, para la extensión 1 min. a 72°C y un ciclo de extensión a 72°C por un minuto.

De los productos de reacción se tomaron 15 µl y se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 3% en buffer Tris-Borato a 250 v durante 30 a 35 min. Finalmente este se tiñó con bromuro de etidio y se observó en transiluminador de UV a 260 nm. (Cerón *et al.*, 1995).

Una segunda PCR se realizó con primers específicos para identificar los genes *cryIIIA*, *cryIIIB*, *cryIIIC*, *cryIIIC-gall*, *cryIIICb*, *cryIIICc*, *cryIIID* y *cryIIIE*. Esta reacción se preparó bajo

el procedimiento arriba descrito. En la Tabla. 2 se muestran las características de los primers específicos.

### **3. Determinación de Proteína total.**

Cada una de las cepas seleccionadas, se sembró en caja de Petri con agar nutritivo y se mantuvieron a 37°C hasta esporulación (120 h). Se cosechó el crecimiento obtenido con agua destilada estéril. La mezcla spora-cristal se lavó dos veces con agua destilada y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min. a 4°C. El paquete así obtenido se resuspendió en 500 µl de H<sub>2</sub>O estéril y se le determinó el contenido de proteína total por el método de Lowry *et al.* De cada una de las cepas seleccionadas se tomaron 5 µl y se diluyeron en 195 µl de agua destilada. En una solución alcalina de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% y NaOH 0.1 N se solubilizaron los cristales en presencia de CuSO<sub>4</sub> y se agregó el reactivo de Folin diluido. Las muestras se reposaron por 30 min. y se cuantificó su contenido proteico al medir su absorbancia a 750 nm en un espectrofotometro.

### **4. La purificación del cristal proteico.**

La mezcla de spora-cristales se obtuvo después de cinco días de incubación, al lavar el crecimiento obtenido con agua destilada. Por centrifugación se concentraron las mezclas, se lavaron con agua destilada y se centrifugaron 15 min. a 10,000 rpm dos veces. Los cristales se separaron de las esporas en un gradiente de Buffer de fosfatos y polietilenglicol, colectando la interfase. Los cristales así obtenidos se conservaron en refrigeración a – 20°C hasta su utilización.

**Tabla 7. Características de los primers específicos**

Primer	Secuencia	Gen reconocido	Talla del producto (pb)
CJ14	5'GGAACCAAGACGAACTATTGC	<i>cryIEa</i>	147
CJ15	5'GGTTGAATGAACCCTACTCCC		
CJ14	5'GGAACCAAGACGAACTATTGC	<i>cryIEb</i>	147
CJ15	5'GGTTGAATGAACCCTACTCCC		
CJ16	5'TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC	<i>cryIF</i>	177
CJ17	5'CGGTTACCAGCCGTATTTCCG		
CJ16	5'TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC	<i>cryIFa</i>	177
CJ17	5'CGGTTACCAGCCGTATTTCCG		
CJ16	5'TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC	<i>cryIFb</i>	177
CJ17	5'CGGTTACCAGCCGTATTTCCG		
CJ18	5'ATATGGAGTGAATAGGGCG	<i>cryIG</i>	235
CJ19	5'TGAACGGCGATTACATGC		
CJIIIcte22	5'CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIA</i>	285
CJIIIA23	5'CCCCGTCTAAACTGAGTGT		
CJIIIcte22	5'CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIB</i>	285
CJIIIB24	5'AACGAAAGATTCTGCTCC		
CJIIIcte22	5'CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIC</i>	535
CJIIIC25	5'CCTATTCTTTCATTTTGACC		
CJIIIcte22	5'CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>CryIIIC-gall</i>	211
CJIIICg26	5'AGTGGAGAGTTTACGGTAGCC		
CJIIIcte22	5'CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIID</i>	312
CJIIID27	5'CGAAATACGAAATACTATGAG		
CJIIIE28	5'TGACAAGTACTGGATTCTGCAA	<i>cryIIIE</i>	394
CJIIIE29	5'GTTGTTGATGAGGTTCCCCTT		

la misma edad. Las condiciones ambientales del bioensayo fueron de 33°C y de 70 % de humedad relativa. La prueba se repitió tres veces.

Los adultos se expusieron a la toxina por 30 días. Terminado este tiempo se contó el número de adultos y larvas vivos o muertos. Se construyeron tablas de contingencia y los resultados se analizaron mediante  $\chi^2$ .

No se contaron larvas muertas debido a que por su tamaño pequeño no fue posible diferenciar las mudas de otras larvas.

## **7. Perfil de plásmidos**

Las cepas seleccionadas se activaron en cajas de Petri con agar nutritivo durante 12 h, se tomó una colonia y se inocularon tubos con caldo nutritivo manteniéndose en agitación constante a 150 rpm a temperatura ambiente durante 20 h.

Se cosechó el crecimiento celular por centrifugación a 12,000 rpm durante 2 minutos. El paquete celular se lavo dos veces con solución salina (NaCl 0.85%) y se resuspendió en 50  $\mu$ l de lisozima. Se incubaron a 37°C durante 3 h, hasta la formación de protoplastos.

Se prepararon geles de agarosa al 0.7 % y se colocaron en una cámara electroforética vertical. Se agregaron 40  $\mu$ l de la mezcla de SDS en cada uno de los carriles y se dejó reposar durante 20 min. Finalmente se agregaron los lisados celulares por debajo de la mezcla de SDS y se reposaron por 20 min.

La electroforesis se desarrolló a corriente constante: 3 mA durante 1 h 45 min., Después a voltaje constante: 45 volts durante 50 min. y finalmente a 120 volts por espacio de 2 h.

Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio al 0.3% y se observaron al transiluminador UV. Se incluyeron como controles las cepas HD73, Btt y GM-33.

## 8. Resistencia a los antibióticos.

Las cepas bajo estudio se activaron en caldo nutritivo durante la noche y se sembraron en agar nutritivo por extensión. Inmediatamente se colocaron sensidiscos para Gram positivos y se incubaron 24 – 48 horas. Al observar el halo de inhibición se consideraron tres categorías: Resistentes, susceptibles y moderadamente resistentes. Los antibióticos y las dosis contra las que se probaron dichas cepas se presentan en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Productos y dosis probadas en la determinación de resistencia a los antibióticos

Antibiótico	Símbolo	Dosis
Ampicilina	AM	10 µg
Cefalotina	CF	30 µg
Cefotaxima	CTX	30 µg
Ceftazidima	CAZ	30 µg
Cefuroxima	CXM	30 µg
Dicloxacilina	DC	1 µg
Eritromicina	E	15 µg
Gentamicina	GE	10 µg
Pefloxacina	PEF	5 µg
Penicilina	PE	10 U
Tetraciclina	TE	30 µg
Trimetoprim Sulfametoxazol	SXT	25 µg

## 9. Determinación de la $\beta$ -exotoxina

La producción de la  $\beta$ -exotoxina se realizó mediante el Procedimiento de Arévalo- Niño y Galán- Wong (1994). Las cepas HD1 y HD59 se utilizaron como control negativo y positivo respectivamente; GM-80, GM-83 y C-9 fueron las cepas a caracterizar. Todas ellas se activaron en agar nutritivo por 24 h a 37°C, y se inocularon 50 ml de caldo nutritivo con cada una de las mismas, manteniéndose en agitación a 150 rpm por 18 h. Posteriormente se tomaron 2 ml del inóculo respectivo y se transfirieron a 200 ml de medio de Conner y Hansen, Estos se incubaron en agitación rotatoria a 150 rpm durante 48 h a 37°C. El medio de cultivo se centrifugó a 10,000 rpm por 30 m. Para obtener el sobrenadante, se esterilizó a 120°C por 15 minutos y filtrado en membranas Milipore® de 0.2  $\mu$ m. Se tomaron 20 ml del sobrenadante, se concentró por evaporación y se precipitó con etanol. El precipitado obtenido se disolvió en agua destilada y se analizó espectrofotométricamente a 260 nm. Las lecturas de absorbancia se transformaron a concentración usando el coeficiente de extinción molar reportado por Sebesta *et al.* (1973) para esta determinación.



# RESULTADOS

## 1. Aislamiento de las cepas de Bt

Se visitaron las bodegas de los Almacenes Nacionales de Depósito S.A. (ANDSA) y bodegas rústicas de granos almacenados del noreste del Estado. En ellas se colectaron muestras de insectos muertos. A partir de estos se aislaron colonias de bacilos no esporulados, los cuales no fueron productoras de inclusiones cristalinas proteicas.

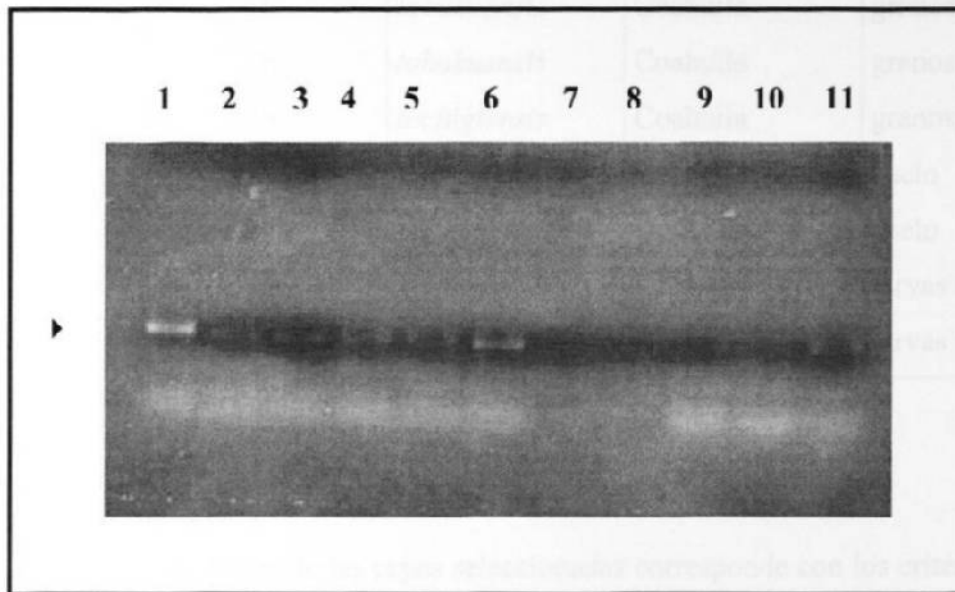
## 2. Identificación de las cepas

De la Colección Internacional de Bt que posee la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL se seleccionaron previamente cepas aisladas de granos almacenados y aquellas obtenidas de regiones semiáridas del norte de México, debido a que estas son condiciones que favorecen el ataque de Tc y Os. Se inspeccionaron inicialmente 230 cepas, de las cuales 32 cumplieron con estos criterios.

A través de PCR se determinó la presencia de genes *cryIII* en las cepas previamente seleccionadas y de colonias de bacilos no esporulados aisladas de insectos muertos de *Tribolium castaneum*. La amplificación del DNA se realizó con los primers generales para *cryIII*; el tamaño esperado de los productos de PCR fue de ca. 650 pb y concuerda con lo reportado por Cerón *et al.*, 1995.

La figura 2 muestra los resultados obtenidos de la amplificación del DNA. En esta reacción se incluyeron dos cepas como control negativo (carriles 9 y 10) y una cepa como control

positivo (carril 11). El DNA bacteriano se obtuvo por un procedimiento de lisado rápido (ebullición de una asada de la colonia y resuspendida en 50  $\mu$ l de agua) para permitir el análisis de diferentes muestras al mismo tiempo. Las diferencias en la intensidad de la banda se deben a que no se controló la cantidad de DNA templado que se incluyó en la reacción. Para evitar falsos positivos se realizó PCR al menos en dos ocasiones. La flecha indica la señal positiva a *cryIII*.



**Figura 2.** Amplificación del DNA de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*  
Línea 1, GM-79; 2, GM-80; 3, GM-83; 4, JM-1; 5, JM-2; 6, C-9; 9, GM-78; 10, GM-43; 11, Btt.

Diez cepas de Bt resultaron portadoras de genes *cryIII*. Todas las cepas fueron productoras de inclusiones cristalinas. La esporulación y producción del cristal proteico se inició después de 72 h y alcanzó su máximo a las 120 h. La forma del cristal insecticida de las cepas seleccionadas fue bipiramidal y cuadrado. No se encontraron genes tipo *cryIII* en los bacilos no esporulados. En la siguiente Tabla se describen las cepas de Bt que resultaron positivas a los genes tipo *cryIII*.

**Tabla 9.** Cepas de *Bacillus thuringiensis* positivas a *cryIII*.

Cepa	Tipo de cristal*	Serovariedad	Procedencia	Aislada de
GM-33	b	<i>monterrey</i>	Michoacán	suelo
GM-43	b	<i>mexicanensis</i>	Nuevo León	suelo
GM-68	b	<i>sotto</i>	Nuevo León	granos
GM-79	b	<i>tohokuensis</i>	Coahuila	granos
GM-80	b	<i>tohokuensis</i>	Coahuila	granos
GM-83	b	<i>tochigiensis</i>	Coahuila	granos
JM-1	b	n.i.	Durango	suelo
JM-2	b	n.i.	Durango	suelo
C-9	c	<i>kumamotoensis</i>	Durango	larvas muertas
Btt	c	<i>morrisoni</i>	Alemania	larvas muertas

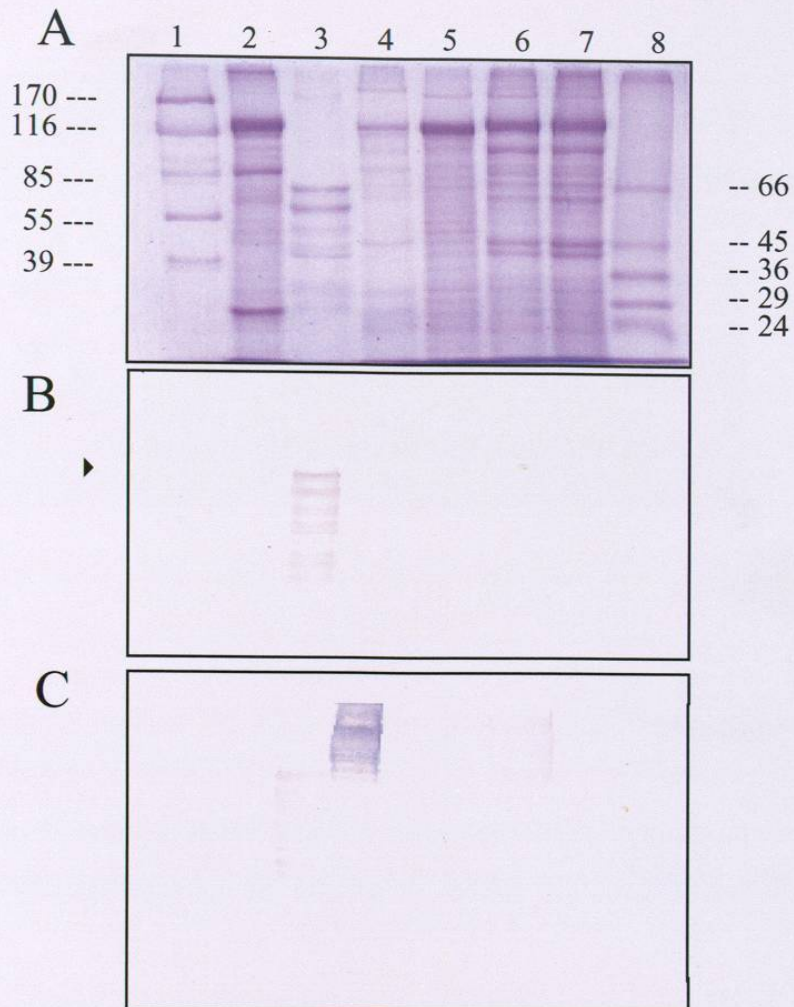
\* b= bipiramidal; c= cuadrado; n.i.= no identificado

En general, el origen de las cepas seleccionadas corresponde con los criterios establecidos al inicio de la investigación: procedentes de regiones áridas o semiáridas y aisladas en ambientes donde el control biológico se presenta en forma natural en los granos almacenados. De acuerdo con Markham (1992) el control biológico a través de enemigos naturales estará encaminado no para lograr un equilibrio permanente entre plaga y enemigo sino simplemente provocar una alta mortalidad en la plaga. De esta forma las cepas seleccionadas constituyen un medio potencial y prometedor para el control de plagas en el almacén.

Estas mismas cepas se sometieron a una segunda PCR utilizando los primers específicos descritos por Cerón y col. (1995). Sin embargo ninguna de estas cepas resultó positiva a esta reacción. Esto sugiere la existencia de nuevos tipos de genes *cryIII* aún no descritos.

### 3. La inmunodetección de proteínas CryIII

El perfil de proteínas revela que todas las cepas sintetizan una proteína de ca. 130 kDa (Figura 3, panel A): Estas proteínas se transfirieron a un papel de nitrocelulosa para detectarse a través de los antisueros Cry3Aa y Cry7A. Los resultados muestran que ninguna de las cepas presentó reacción cruzada con estos antisueros. En el panel B se muestra la reacción cruzada solo con antiCry3Aa señalada por la flecha y en el panel C la reacción cruzada con antiCry7A.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de los cristales proteicos de Bt tóxicos a coleópteros. Líneas 1 y 8 marcadores de talla molecular; 2, HD-73; 3, Btt; 4, GM-33; 5, C9; 6, GM-80; 7, GM-83.

#### 4. Bioensayo

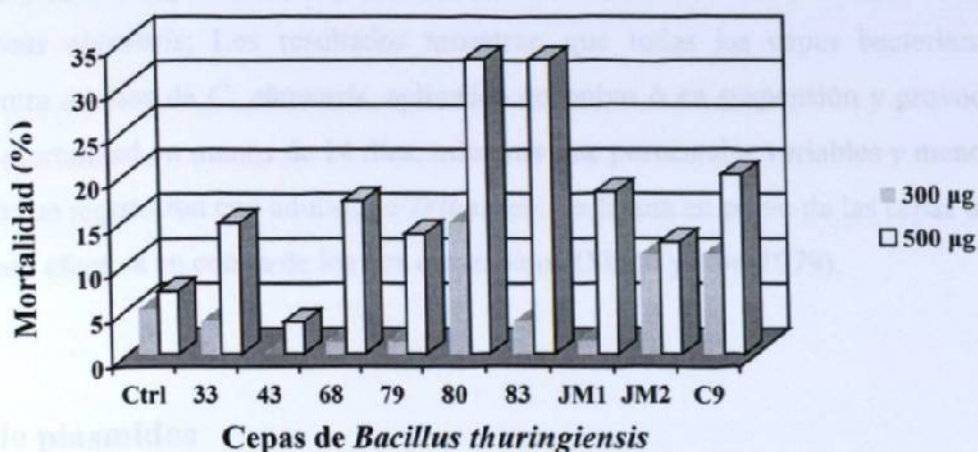
Las cepas probadas fueron: GM-33, GM-43, GM-68, GM-79, GM-80, GM-83, JM-1, JM-2, C-9 y un control donde no se agregó ninguna cepa. La cepa GM-43 se utilizó como control negativo. No se incluyó control positivo debido a que no se ha reportado cepa alguna tóxica contra este insecto. Desde el inicio del bioensayo se apreció el efecto tóxico de las cepas de Bt sobre el desarrollo de las larvas de Tc. Este efecto se presentó a través del cambio de color y la reducción en su tamaño (Figura 4).



**Figura 4.** Efecto detrimental de las cepas de Bt sobre el desarrollo de las larvas de *Tribolium castaneum*.

Los resultados del análisis de  $X^2$  para determinar los efectos de independencia de las cepas sobre la mortalidad de adultos y desarrollo de larvas se presentan en el apéndice. Estos resultados indican que el número de larvas de Tc en el bioensayo, depende de las cepas GM-80 y GM-83 y que este número se reduce al incrementar el tiempo de exposición a la toxina.

En la Figura 5 se presenta la mortalidad de *T. Castaneum* producto del efecto tóxico de las cepas. La prueba de independencia ( $X^2$ ) muestra que el número de insectos muertos depende de las cepas GM-80, GM-83 y C-9.



**Figura 5.** Mortalidad de adultos de *Tribolium castaneum* por efecto de las cepas de Bt

La siguiente Tabla muestra un resumen de la mortalidad encontrada en las cepas más prometedoras para el control de Tc y Os.

**Tabla 10.** Mortalidad efectiva\* de adultos de *Tribolium castaneum* (Tc) y *Oryzaephilus surinamensis* (Os) por efecto de las cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Cepa	Tc	C.V.	Os	C.V.
GM-80	33	5.90	46	8.16
GM-83	33	7.68	9	7.83
C-9	20	7.95	48	8.19

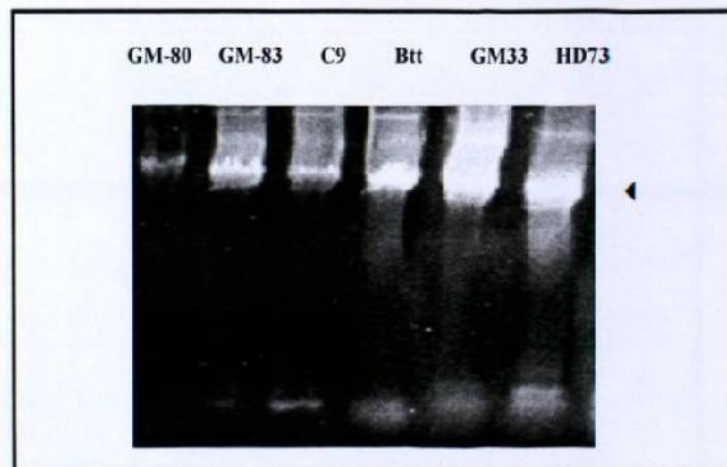
\* los valores corresponden al promedio de tres experimentos; C.V. Coeficiente de variación

Todas las cepas seleccionadas tuvieron actividad tóxica contra *T. Castaneum*, con valores máximos de mortalidad del 33% para GM-80 y GM-83 y mínimos para C-9 con una mortalidad del 20%. Las cepas C9 y la GM-80 presentaron la mortalidad más alta para Os con valores del 48 y 46% respectivamente. La cepa GM-83 presentó una mortalidad mínima del 9%. Estos resultados se sustentan en el coeficiente de variación obtenido en los bioensayos y superan a los reportados por Singh y Hori. 1979 quienes encontraron una mortalidad del 8% en Tc con el uso de Bt.

Existen otros reportes sobre el efecto de diferentes serotipos de Bt: *aizawai*, *kurstaki*, *thuringiensis* y *soto* comparado contra una mezcla de adultos de *T. confusum*, *T. castaneum*, y *Callosobruchus chinensis*; Los resultados muestran que todas las cepas bacterianas fueron efectivas contra adultos de *C. chinensis*, aplicados en polvo ó en suspensión y provocaron más del 90% de mortalidad en menos de 14 días, mientras que porcentajes variables y menores al 8% de mortalidad se registraron con adultos de *Tribolium*. La forma en polvo de las cepas bacterianas parece ser más efectiva en contra de los tres escarabajos (Singh y Hori.1979).

## 5. Perfil de plásmidos

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* presentaron diferentes perfiles de plásmidos. En la figura 6 se muestran dichos perfiles.



**Figura 6.** Perfil de plásmidos de las cepas seleccionadas

La cepa GM-80 presentó solamente un solo plásmido, la GM-83 dos y la C-9 tres, Btt cinco, GM-33 cuatro y la cepa control HD-73 presentó cinco plásmidos. La flecha señal el DNA cromosomal.

## 6. Resistencia a los antibióticos.

Las cepas seleccionadas se activaron en caldo nutritivo durante 18 h, para después tomar 200 µl y sembrar por extensión en caja de petri con agar nutritivo. Inmediatamente se colocaron los multidiscos para Gram + y se incubaron durante 24 a 48 h a 37° C. Visualmente se evaluaron las zonas de inhibición de cada antibiótico. En la Tabla 11 se presentan los patrones de resistencia encontrados

**Tabla 11.** Patrón de resistencia de *Bacillus thuringiensis* a los antibióticos.

Antibiótico	Dosis	GM-80	GM-83	C-9	Btt	GM-33	HD-73
Ampicilina	10 µg	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-
Cefalotina	30 µg	+	+	+/-	+	+	+
Cefotaxima	30 µg	+	+	+	+/-	+/-	+
Ceftazidima	30 µg	-	-	-	-	-	-
Cefuroxima	30 µg	+/-	+/-	-	-	+/-	-
Dicloxacilina	1 µg	+	+/-	+/-	-	-	+/-
Eritromicina	15 µg	+	+	+	+	+	+
Gentamicina	10 µg	+	+	+	+	+	+
Pefloxacina	5 µg	+	+	+	+	+	+
Penicilina	10 U	+/-	+/-	-	-	-	+/-
Tetraciclina	30 µg	+	+	+	+	+	+
Trimetoprim-sulfametoxazol	25 µg	-	-	+/-	-	-	-

+ Susceptible, -Resistente, +/- Moderadamente susceptible

Las cepas Btt y GM-33 se incluyeron en esta prueba como control positivos y la HD73 como control negativo. Las cepas GM-80 y GM-83 presentaron patrones de resistencia a los antibióticos similares. Ambas son resistentes a Ceftazidina (30µg) y a Trimetoprim-



sulfametoxazol (25 µg). Estas cepas fueron sensibles a Cefalotina, Cefotaxima, Dicloxacilina, Eritromicina, Gentamicina y Pefloxacina..

A diferencia de estas cepas, la C-9 presentó resistencia a la Ampicilina (10 µg), Ceftazidima (30 µg), Cefuroxima (30 µg) y Penicilina (10 U). Dicha cepa fue susceptible a Cefotaxima, Eritromicina, Gentamicina, Pefloxacina y Tetraciclina

## 7. Determinación de la β-exotoxina

Se realizó un barrido de absorción de 250, 260 y 270 nm de los precipitados etanólicos obtenidos de los sobrenadantes de las cepas en estudio, encontrándose la máxima absorción a 260 nm (Tabla 12). Esto concuerda con lo reportado por Arévalo y Galán (1994). La mayor absorción se presentó en la cepa HD59 incluida en la determinación como control positivo. La cepa HD1 (control negativo) presentó menor lectura que el control donde se incluyó medio estéril.

**Tabla 12.** Lecturas de absorbancia de los precipitados etanólicos.

Cepas	Longitud de onda en nm		
	250	260	270
HD59 c+	2.1650	2.4550	1.9486
HD1 c-	1.1839	1.0459	0.9181
Control	1.6714	1.6120	1.4779
Btt	1.2453	1.0356	0.8515
GM-80	1.6663	1.5752	1.4338
GM-83	0.7660	0.7027	0.6278
C-9	2.1909	1.9028	1.6435

Las lecturas de absorbancia de los extractos de las cepas seleccionadas se compararon con aquellas obtenidas de los controles positivo y negativo, las lecturas de las cepas GM-80, GM-83 y Btt fueron menores que el control negativo., con esto se demuestra que dichas cepas no producen  $\beta$ -exotoxina. La cepa C9 presentó una absorbancia muy cercana a la del control positivo. Se utilizó el coeficiente de extinción molar propuesto por Sebesta et al. (1973) para calcular la concentración de esta toxina; 0.167 mg/l correspondieron a la cepa HD59 y 0.1294 mg/l para la cepa C9.

Arevalo-Niño en comunicación personal, establece que la producción de  $\beta$ -exotoxina puede variar según las condiciones en que se lleve a cabo el análisis, además del propio microorganismo en estudio.

Con estos resultados se establece la posibilidad de utilizar las cepas GM-80, GM-83 y C-9 como posibles medios de control biológico de *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus surinamensis* sin ningún riesgo para la salud humana.

## DISCUSION

Se ha reportado el control de *Bacillus thuringiensis* sobre algunos coleopteros como *Leptinotarsa decemlineata* (Donovan, 1988; Mac Intosh, 1990; Rugar, 1991; Zehnder, 1992) *Diabrotica undecimpunctata* (Rugar, 1991); *Tenebrio molitor* (Chilcott, 1993); *Tribolium confusum* (Singh, 1979; Arthur, 1994); *Tribolium castaneum* (Singh, 1979), con diferentes valores de mortalidad debido a la variación en las condiciones experimentales en que se han conducido los bioensayos y a la diferencia entre especies de insectos.

Las condiciones experimentales del bioensayo fueron definidas en primer orden, mediante la prueba de diferentes dietas para el insecto. La dieta que presentó el mayor numero de larvas y de adultos fue harina de trigo mas 5% de levadura de cerveza. Via. (1999) establece que el suministro de almidón y de proteína son esenciales para la multiplicación de Tc y así evitar el canibalismo cuando los insectos se establezcan en un nuevo ambiente.

La unidad experimental en la que se probó la toxicidad de las cepas fue una caja de Petri que contenía 4 g de harina y 25 adultos. El análisis estadístico a través de  $X^2$  permitió sustentar el uso de dicha unidad y encontrar que la mortalidad y el desarrollo de larvas y adultos depende de las cepas probadas. Con estos resultados definimos un procedimiento estandarizado para el bioensayo.

Debido a la estructura del bioensayo, la mortalidad se registró 15 días después de la aplicación de la mezcla spora-cristal, no obstante, es posible que el efecto tóxico se presentara en menor tiempo. Singh y Hori, 1979 registraron porcentajes variables de mortalidad con adultos de *Tribolium* en menos de 14 días y agregan que la forma en polvo de las cepas bacterianas parece ser más efectiva en contra del escarabajo, estos resultados son consistentes con los nuestros.

De las 32 cepas seleccionadas inicialmente, nueve presentaron toxicidad contra Tc y tres de ellas pueden utilizarse potencialmente para el control del gorgojo castaño de la harina; con una

mortalidad del 33% para las cepas GM-80 y GM-83; del 20% para C9. Estas cepas provocaron una mortalidad sobre Os del 46, 9 y 48 % respectivamente. Es posible que al mezclar la toxina con estimulantes alimenticios el consumo de Bt pudiera elevar su efecto tóxico. Por otra parte existen reportes que a través de mutaciones en la estructura de las proteínas CryIII es posible incrementar su efecto tóxico sobre coleopteros, según lo reportaron Wu y col. en 1996 para *Tenebrio molitor* y *Leptinotarsa decemlineata*.

Por otra parte, se han controlado algunos coleopteros con diferentes cepas de Bt y se han identificado según el serotipo flagelar como *thuringiensis*, *aizawai*, *kurstaki* y *soto* (Singh, 1979); *tenebrionis* (Krieg *et al.*, 1983); *san diego* (Herrnstadt *et al.*, 1986); *tholworthi* (Sick *et al.*, 1990; Rugar *et al.*, 1991); *morrisoni* (Rahardja, 1995) *kumamotoensis* (Rugar *et al.*, 1991) Las serovariedades a las que pertenecen las cepas seleccionadas en este trabajo son *kumamotoensis* (C-9), *tohokuensis* (GM-80) y *tochiensis* (GM-83).

Los resultados muestran que las cepas seleccionadas en este trabajo portan genes que pertenecen a la familia *cryIII* pero no corresponden con ninguno de los genes específicos descritos por Cerón y col. (1995). Estos resultados indican la presencia de cepas que pueden portar potencialmente nuevas proteínas Cry, y que constituyen una alternativa potencial para el control químico de plagas en harina sin peligro al medio ambiente y para la salud humana.

## CONCLUSIONES

Los productos de esta investigación permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Se definió un procedimiento estandarizado para evaluar la toxicidad de Bt sobre coleópteros como Tc y Os.
2. Las cepas GM-43, GM-68, GM-79, GM-80, GM-83, JM-1, JM-2 y C9 portan genes que pertenecen a la familia *cryIII* pero no corresponden con ninguno de los genes específicos descritos.
3. Las cepas GM-80, GM-83 y C-9 son tóxicas para *Tribolium castaneum* y *Oryzaephilus surinamensis*.
4. Las cepas GM-80, GM-83 y C-9 pueden portar potencialmente nuevas proteínas Cry, que constituyen una alternativa potencial al control químico de plagas en harina sin peligro al medio ambiente y para la salud humana.

## Literatura Revisada

- Adams, L. F., S. Mathews, P. O'Hara, A. Petersen and H. Gurtler. 1994. Elucidation of the mechanism of CryIIIa overproduction in a mutagenized strain of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Mol. Microbiol.* **14**: 381-389.
- Arévalo-N, K y L.J. Galán-W. 1994. Uso de un método sencillo para detección de  $\beta$ -exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist.* **19**(4): 385-391.
- Aronson, A. L., E.-S. Han, W. McGaughey y D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 981-986.
- Arthur, F.H. y S.L. Brown. 1994. Evaluation of diatomaceous earth ( *Insecto* ) and *Bacillus thuringiensis* formulations for insect control in stored peanuts. *J. Entomol. Science* **29**: 176-182.
- Badii, M.H. 1993. Ecología de control microbiano de insectos. En: *Biotecnología para producción de Bioinsecticidas microbianos centrada en Bacillus thuringiensis*. UNAM. pp 13-18.
- Bai, C., D. Degheele, S. Jansen y B. Lambert. 1993. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker) *J. Invertebr. Pathol.* **62**: 211-215.
- Bauer L.S. 1992. Response of the imported willow leaf beetle to *Bacillus thuringiensis* var *san diego* on poplar and willow. *J. Invertebr. Pathol.* **59**: 330-331.
- Bauer L.S. y H.S. Pankratz. 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. *J. Invertebr. Pathol.* **60** : 15-25.

- Bietlot, H. P., P. R. Carey, M. Pozgay and H. Kaplan. 1989. Isolation of carboxyl-terminal peptides from proteins by diagonal electrophoresis: application to the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Anal. Biochem.* **181**: 212-215.
- Bradley, D., M.A. Harkey, M.K. Kim, K.D. Biever y L.S. Bauer. 1995. The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **65** : 162-173.
- Bravo, A. S. Jansens y M. Peferoen. 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 237-246.
- Carozi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S.Evola y M.G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 3057-3061.
- Carrol, J., J. Li y D.J. Ellar. 1989. Proteolytic processing of a coleopteran-specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J.* **261**: 99-105.
- Carrol, J., D. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie y D. J. Ellar. 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* **70**:41-49.
- Cerón,J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca y A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3826-3831.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Fitelson, E. Schepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:807-813.

- Chen, Q., G. Jelenkovic, C.K. Chin, S. Billings, J. Eberhart y J.C. Goffreda. 1995. Transfer and transcriptional expression of coleopteran *cryIIIB* endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* in eggplant. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **120**:921-927.
- Cheng, J., M.G. Bolyard, R.C. Saxena y M.B. Sticklen. 1992. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *Plant Sci.* **81**:83-91.
- Chestukina, G. G., S.A. Tyurin, L. I. Kostina, A. L. Osterman, I. A. Zalunin, O. A. Kodova y V. M. Stepanov. 1990. Subdomain organization of *Bacillus thuringiensis* entomocidal proteins N-terminal domains. *J. Protein. Chem.* **9**:501-507.
- Chilcott, C.N. y P.J. Wigley. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealy. *J. Invertebr. Pathol.* **61**: 244-247.
- Choma C. T., W. K. Surewicz y H. Kaplan. 1991. The toxic moiety of the *Bacillus thuringiensis* protoxin undergoes a conformational change upon activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 933-938.
- De Barjac, H. and A. Bonnefoi. 1972. Presence of antigenic subfactors in serotype V of *Bacillus thuringiensis* with the description of a new serotype: *B. thuringiensis* var. *canadiensis*. *J. Invertbr. Pathol.* **20**: 212-213.
- Dobie, P., C.P. Haines, R.J. Hodges, P.F. Prevett y D.P. Ress. 1991. Insects and arachnids of tropical stored products: Their biology and identification. 2nd Edition Rev. and De. C.P. Haines. National Resources Institute. Orveseas Dev. Adm. Kent, U.K. p.p 73.
- Donahaye, E.J.; Navarro, S.; Rindner, M. 1995. Low temperature as an alternative to fumigation for desinfecting dried fruti from three insect species. *Journal of stored products research.* **31(1)**: 63-70.



- Donahaye, E.J.; Navarro, S.; Rindner, M.; Azrieli, A. 1996. The combined influence of temperature and modified atmospheres on *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of stored products research*. **32**(3): 225-232.
- Donovan, W.P., J.M. Gonzalez Jr. y M.P. Gilbert. 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *J. Bacteriol.* **170** : 4732-4738.
- Donovan, W.P., J.M. Gonzalez Jr., M.P. Gilbert y C. Dankocsik. 1988. Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequences of the toxin gene. *Mol. Gen. Genet.* **214** : 365-372.
- Donovan, W.P., M.J. Rugar, A.C. Stanley, T. Malvar, M.C. Gawron-Burke y T.B. Johnson. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. *Appl. Environ. Microbiology* **58**: 3921-3927.
- Dowdy, A.K. 1999. Mortality of red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) exposed to high temperature and diatomaceous earth combinations. *Journal of stored products research*. **35** (2): 175-182.
- Du, C., P. A. W. Martin y K. W. Nickerson. 1994. Comparison of disulfure contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3847-3853.
- FAO. 1983. Post-harvest losses in quality of food grains. FAO. Food and Nutrition paper 29. FAO. Rome, Italy. Pp. 56- 75.
- Faust, R.M. y A. Lee Jr. Bulla. 1982. Bacterial and their toxins as insecticides in microbial and viral pesticides. Ed. Eduard Kurstaki. Marcel Dekker, Inc. N. Y. p.p 75-206.

- Fields, P. and Korunic, Z. 2000. The effect of grain moisture content and temperature on the efficacy of diatomaceous earth from different geographical locations against stored-product beetles. *Journal of stored products research*. **36**(1): 1-13.
- Gaitz, E., P.La Rocca, M. S. P. Sansom y Y. Shai. 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12289-12294.
- Galán-Wong, L.J. 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. pp 97-101.
- Hagstrum, D.W. and P.W. Flinn. 1998. Integrated pest management of stored-grain insects. En: *Storage of cereal grains and their products*. USDA. pp 535-545.
- Hall, D. W. 1970. *Handling and storage of food grains in tropical and subtropical areas*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
- Herrnstadt, C., T.E. Gilroy, D.A. Sobieski, B.D. Bennett y F.H. Gaertner. 1987. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene* **57** : 36-46.
- Hofmann, C., H. Vyerbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens, y H. Van Mallaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of a high-affinity binding sites in the brush border membrane of a target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85** : 7844-7848.
- Hofte, H. y H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* . *Microbiol. Rev.* **53** : 242-255.

- Hofte, H., J. Seurinck, A. Van Houtven y M. Vaeck. 1987. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against coleoptera. *Nucleic Acids Res.* **15** : 7183.
- Hodgman, T.C. and D.J. Ellar. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Seq.* **1**: 97-106.
- Hough-Goldstein, J., A.M. Tisler, G.W. Zehnder y K.A. Uyeda. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) consumption of foliage treated with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* and various feeding stimulants. *J. Econ. Entomol.* **84** :87-93.
- Huang, Y. and Ho, S.H. 1998. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of stored products research.* **34**(1): 11-17.
- Huang, Y.; Tan, J.M.W.L.; Kini, R.M. and Ho, S.H. 1997. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of stored products research.* **33**(4): 289-298.
- Juárez-P, V.M.; M.D. Ferrandis and R. Frutos. 1997. PCR-Based Approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. *Appl. Environ. Microbiology* **63** : 2997-3002.
- Kim, H.S.; D.W. Lee; S.D. Woo, Y.M. Yu, and S. K. Kang. 1998. Biological, immunological, and genetic analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from granary in Korea. *Current Microbiology.* **37**:52-57.
- Knight, P. J. K., B. H. Knowles y D. J. Ellar. 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) toxin. *J. Biol. Chem.* **270**: 17765-17770.

- Knowles, B. H. y J. A. T. Dow. 1993. The crystal  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioassays* **15**: 469-476.
- Kramer, K.J., L.H. Hendricks, J.H. Wofciak y J. Fyler. 1985. Evaluation of fenoxicarb-*Bacillus thuringiensis* and malation as grain protectants in small bins. *J. of Economic Entomology* **78** : 632-636.
- Krieg, A., A. Huger, G. Langenbruch and W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *J. Appl. Entomol.* **96**: 500-508.
- Koller, C.N., L.S. Bauer y R.M. Hollingworth. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native  $\delta$ -endotoxin crystals. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **184** : 692-699.
- Lambert, B., H. Hofte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert y M. Peferoen. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiology* **58** : 2536-2542.
- Lambert, B., W. Theunis, R. Aguda, K. Van Audenhove, C. Decock, S. Jansens, J. Seurinck y M. Peferoen. 1992. Nucleotide sequence of a gene *cryIIID* encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Gene* **110** : 131-132.
- Lecadet, M.M., V.C. Dumanoir, E. Frachon, H. Ripouteau. 1994. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (classified by H serotypes). International entomopathogenic Bacillus Centre. Unite des Bacteries entomopathogenes. Institut Pasteur. France.

- Leos, M. J. y M. O. Cortez Rocha. 1993. Análisis de la situación nacional. V Simposio Nacional de Entomología de Granos Almacenados. XXVIII Congreso Nacional de Entomología, Cholula, Puebla, México. p.p 14-21.
- Li, J.D., J. Carroll y D.J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353** : 815-821.
- Liang, Y., S. S. Patel and D. H. Dean. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* **270**: 24719-24724.
- Lindbland, C. y L. Druben. 1979. Almacenamiento de Grano. Manejo, secado, silos, control de insectos y roedores. Trad. Javier Jiménez Ortega. Edit. Concepto, S.A., México, p. 143.
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, R.S. Jokerst y R.L. Fuchs. 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** : 8930-8933.
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, S.R. Sims, P.L. Hunst, J.T. Greenplate, P.G. Marrone, F.J. Perlak, D.A. Fischhoff y R.L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invertebr. Pathol.* **56** : 258-266.
- Markham, R.H. 1992. Control biológico en granos almacenados: Metodologías de la investigación. *Memorias del IV Simposio de Plagas de los Granos Almacenados.* Pp 58-66.
- Mohan, S. and Fields, P.G. 2002. A simple technique to assess compounds that are repellent or attractive to stored-product insects. *Journal of stored products research.* **38**(1): 23-31.

- Pittendrigh, B.R.; Huesing, J.E.; Shade, R.E. and Murdock, L.L. 1997. Effects of lectins, CRY1A/CRY1B  $\delta$ -endotoxin, PAPA, protease and  $\alpha$ -amylase inhibitors, on the development of the rice weevil, *Sitophilus oryzae*, using an artificial seed bioassay. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **82**(2): 201-211.
- Quintero, R., J.L. Solleiro, V.M. Morales, R. Castañón y B. López. 1997. Plan de negocios para la producción de *Bacillus thuringiensis* Cambiotec. México, D.F:
- Rahardja U. y M.E. Whalon. 1995. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Cry IIIA-Endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* **88** : 21-26.
- Ramírez-Genel, M. 1966. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. 1a. Ed. CECSA. México, p.p. 169-171.
- Ramírez M., M. 1986. Biología e identificación de insectos de granos almacenados. En: Manejo y conservación de granos y semillas. Programa Universitario de Alimentos. UNAM. México p.p. 130-131.
- Rentería-Gutierrez, T.R., Moreno-Martínez, E. And Barrón-Hoyos J.M. 2000. Population growth of *Rhizoperta dominica* (F) and *Tribolium castaneum* (H) in different wheat varieties and groups commercially produced in Sonora, México. *Southwestern Entomologist*. **25**(3): 213-220.
- Ríos-Ibarra, R.M. 1992. Una perspectiva ecológica para el manejo de los problemas entomológicos de los granos almacenados en México. Memorias del IV Simposio de Plagas de los Granos Almacenados. Pp 6-10.
- Robert. P., J. Chaaufaux y M. Marchal. 1994. Sensitivity of larval *Oxythyrea funesta* (Coleoptera: Scarabeidae, Cetoniinae) to three strains of *Bacillus thuringiensis* (Subsp. *Tenebrionis* ). *J. Invertebr. Pathol.* **63** : 99-100.

- Rodríguez-Padilla, C. y L.J. Galán-Wong. 1992. Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos: Catálogo de cepas de *Bacillus thuringiensis*. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, N.L., México.
- Rupar, M.J., W.P. Donovan, R.G. Groat, A.C. Slaney, J.W. Mattison, T.B. Johnson, J.F. Charles, V.C. Dumanoir y de Barjac H. 1991. Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 3337-3344.
- Sanchis, V. y D. J. Ellar. 1993. Identification y partial purification of a *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxins binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. *FEBS Lett.* 316:264-268.
- Sangadala, S., F. S. Walters, L. H. English y M. J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and  $^{86}\text{Rb}^+$ - $\text{K}^+$  efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269:10088-10092.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler y D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
- Sebesta, K. and K. Horská. 1973. The fate of exotoxin *Bacillus thuringiensis* in mice. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 38: 2533-2537.
- Sick, A., F. Gaertner, and A. Wong. 1990. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Nucleic Acids Res.* 18:1305
- Singh, D.R. y K. Hori. 1979. A laboratory study of effectiveness of certain bacteria on storage pests. *Research Bulletin of Obihiro University Series* 111: 463-468.

- Sutton, D.W., P.K. Havstad y J.D. Kemp. 1992. Synthetic *cryIIIa* gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. *Transgenic Res.* 1:228-236.
- Taylor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan y S. Ely. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxina entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* 6 : 1211-1217.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Trematerra, P.; Sciarreta, A. And Tamasi, E. 2000. Behavioural responses of *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* to naturally and artificially damaged durum wheat kernels. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 94(2): 195-200.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji y L. A. Bulla, Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinant of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385.
- Via, S. (1991). Variation between strains of the flour beetle *Tribolium castaneum* in relative performance on five flours. *Entomologia exp. Apl.* 60: 173-182.
- Via, S. (1999). Cannibalism facilitates the use of a novel environment in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Heredity* 82: 267-275.



- Von tersch, M.A., S.L. Slatin, C.A. Kulesza y L.H. English. 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin Cry IIIB2 and Cry IIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 3711-3717.
- Whalon, M.E., D.L. Miller, R.M. Hollingworth, E.J. Grafius y J.R. Miller. 1993. Selection of a colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **86** : 226-233.
- Wolfersberger, M., P. Luthy, A. Maurer, P. Parenti, V.F. Sacchi, B. Giordana y G.M. Hanozet. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86**: 301-308.
- Wu, D. y A. I. Aronson. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**:2311-2317.
- Zehnder, G.W. y J. Speese III. 1991. Evaluation of various spray nozzle and volume combinations for control of colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) with synthetic and biological insecticides. *J. Econ. Entomol.* **84** : 1842-1849.
- Zehnder, G.W., G.M. Ghidui y J. Speese III. 1992. Use of the occurrence of a peak colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) egg hatch for timing of *Bacillus thuringiensis* spray applications in potatoes. *J. Econ. Entomol.* **85** : 281-288.

## **APENDICE A**

**Tablas de contingencia obtenidas en el análisis de  $X^2$**

Tablas de contingencia obtenidas en el análisis de  $X^2$ . Las tablas se presentan de acuerdo a las preguntas planteadas para valorar el efecto de las cepas de Bt.

¿ El numero de larvas depende de la cepa de Bt presente en la dieta?

Cepa	15 días		30 días	
	$X^2$	$\alpha$	$X^2$	$\alpha$
GM-33	1.045	N.S.	5.498	*
GM-43	2.175	N.S.	1.816	N.S.
GM-68	0.010	N.S.	0.837	N.S.
GM-79	1.233	N.S.	0.158	N.S.
GM-80	5.775	*	2.326	N.S.
GM-83	4.676	*	1.043	N.S.
JM1	1.724	N.S.	0.018	N.S.
JM2	0.760	N.S.	1.962	N.S.
C9	3.402	N.S.	0.722	N.S.

15 y 30 días de exposición a 500  $\mu\text{g}$  de toxina/g de dieta

¿ El numero de insectos muertos depende de la toxina presente en cada cepa?

Cepa	$X^2$	$\alpha$
GM-33	0.285	N.S.
GM-43	1.009	N.S.
GM-68	0.038	N.S.
GM-79	0.007	N.S.
GM-80	6.350	**
GM-83	6.457	**
JM-1	0.130	N.S.
JM-2	2.975	N.S.
C-9	3.046	*

¿El número de larvas se reduce al incrementar el tiempo de exposición del insecto a la toxina?

Cepa	$\chi^2$	$\alpha$
GM-33	19.937	**
GM-43	2.201	N.S.
GM-68	0.399	N.S.
GM-79	0.522	N.S.
GM-80	1.420	N.S.
GM-83	18.026	**
JM-1	0.045	N.S.
JM-2	8.120	**
C-9	0.652	N.S.

¿El número de adultos emergidos depende de la cepa presente en la dieta?

Cepa	$\chi^2$	$\alpha$
GM-33	0.326	N.S.
GM-43	0.957	N.S.
GM-68	0.020	N.S.
GM-79	0.189	N.S.
GM-80	0.812	N.S.
GM-83	0.606	N.S.
JM-1	3.514	N.S.
JM-2	12.716	**
C-9	3.164	N.S.

## APENDICE B

### Artículos generados a partir de esta investigación:

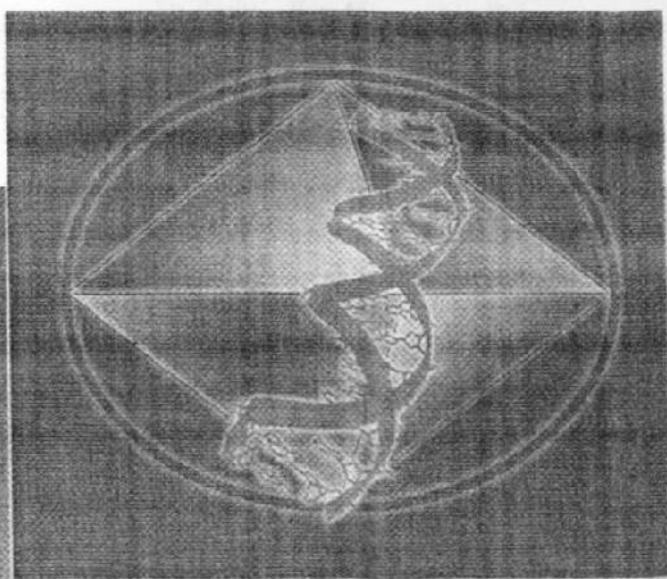
1. Isolation y Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* toxic against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Oryzaephilus Surinamensis* (L.). Publicado en *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*. Vol. 3. The 3<sup>rd</sup> Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. 1999. Beijin, China.
2. Isolation y Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* toxic against the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Oryzaephilus Surinamensis* (L.). Sometido para su publicación en *Food Control*.
3. El cultivo de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) bajo condiciones de laboratorio. Sometido para su publicación en *Ciencia Universitaria*.

# Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*

Volume 3

*Edited by*

Yu Ziniu Sun Ming Liu Ziduo



Science Press  
Beijing New York

# Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*

Volume 3

*Edited by*

Yu Ziniu Sun Ming Liu Ziduo

The 3rd Pacific Rim Conference on Biotechnology  
of *Bacillus thuringiensis*

October 5 - 9, 1999

Wuhan, P. R. China



Science Press  
Beijing New York

1999



## Isolation and Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* Strains Toxic against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.)

Benito Pereyra-Alferez<sup>1</sup>, Ernesto Sanchez-Alejo<sup>1</sup>, Alfonso C. Flores-Guerra<sup>1</sup>,  
Maria M. Iracheta-Cardenas<sup>1</sup>, Luis J. Galan-Wong<sup>1</sup>, Lilia Morales-Ramos<sup>1</sup>,  
Hugo Luna-Olvera<sup>1</sup>, Cristina Rodriguez-Padilla<sup>1</sup>, Hiram Medrano-Roldan<sup>2</sup>,  
Katiushka Arevalo-Nion<sup>1</sup> and Reyes Tamez-Guerra<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biological Sciences,  
New Lira University, Mexico; <sup>2</sup> Durango Technologic Institute, Mexico)

**Abstract:** We isolated from dusts and soil from granaries, several *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strains sharing putative genes encoding for Cry toxins actives against beetles. The relative efficacy of mix spore-crystals of four strains were determined against the store grain pest *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.). Three *Bt* strains, named GM-33, GM-80 and C9, synthesized insecticidal crystal proteins (ICP) displaying, at least, 44% mortality against *O. surinamensis* after 8 days; however, activity against *T. castaneum* was not observed. In the other hand, another strain, key GM-83, kill over 20% of *T. castaneum*. These *Bt* strains were characterized for their flagellar serotype, cry gene-type,  $\beta$ -exotoxin production and insecticidal crystal protein molecular weight. Serotyping results showed that GM-33 is serovar *monterrey*, GM-80 *toholuensis*, C9 *kumamotoensis* and GM-83 is *tochihuensis*. In order to know the putative gene-type, PCR based-experiments were carried out by using general and specific primers for *cryI* and *cryIII* (Ceron *et al.*, 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61: 3826-3831). All strains shared *cry3* or *cry7* genes, GM-33, GM-80 and GM-83 amplifying with *cry7A*, but C9 gave signal only with general *cry3* primers. None *Bt* strain was positive for  $\beta$ -exotoxin. All strains synthesized an ICP of ca. 130 kDa and when they were immunoblotted no one cross-reacted with polyclonal anti Cry3As but all ICP, gave positive signal with an polyclonal antisera raised against ICP from GM-33.

### INTRODUCTION

Biopesticides based on the bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) currently are being used as safe alternatives to chemical insecticides. The entomopathogenic activity of this bacterium is principally due to the presence of proteinaceous inclusions composed by one or several insecticidal crystal proteins (ICP) or Cry proteins. This proteins have been classified in 45 serotypes and 58 serovars and their host range-determined (Bravo *et al.*, 1998). Based on their biological activity, there are toxins specific against the Lepidopteran, Coleopteran and Dipteran insect-orders and, recently activity against nematodes, platyhelminthes and acari was demonstrated (Feitelson, 1993). Many Cry proteins genes have been cloned, sequenced and named *cry* and *cyt* genes. Early gene classification named the Cry proteins specific to lepidopteran as *cryI* and those specific to coleopteran as *cryII* (Hofte and Whiteley, 1989). However, revised nomenclature placed the toxin active against coleopteran insects into *cry3*, *cry7* and *cry8* groups. To date, over 100 *cry* gene sequences have

Correspondence: Dr. Benito Pereyra-Alferez  
los Garza, N.L. Mexico. CP.66430  
Fax: (528) 376-2813  
E-mail: bpereyra@ocr.dia.usnl.mx

Address: Dublin 1012, Colonia, El Refugio II Sector, San Nicolas de

been classified in 22 groups and several subgroups with regard to their amino acid homology (Schnepf *et al.*, 1998). In spite the great variability of Cry proteins, it is still necessary to search for more toxins, since a significant number of pest are not controlled with the available Cry proteins (Bravo *et al.*, 1998). Several countries have been developed intensive screening programs in order to isolate *Bt* strains displaying biological activity against some insects considered as worst pest in store grains such as the sawtoothed grain beetle (*Dryzeophilus surinamensis*) and red flour beetle (*Tribolium castaneum*). At this moment we have not information about success results of *Bt* isolates displaying toxicity against above pests. In this study, we report the isolation and characterization of four *Bt* strains displaying toxicity against the both insects.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection and bacterial isolation

Samples were collected from dusts and soils of granary in Sonora and Chihuahua states located at north of Mexico. Bacteria isolation were carried out as reported by Kim *et al.* (1998). Typical *Bt* colonies were examined under a phase-contrast microscopy for the presence of parasporal inclusions. *Bt* strains were maintained on nutrient agar at 4°C until use.

### Sample preparation and PCR

We decide to introduce, as internal control, *Bt* HD-73 (CryIAc) and *Bt* var. *tenebrionis* (Cry3Aa) in all experiments. *Bt* strains were grown for 12 h on a nutrient medium plate. A loop of cells was transferred to microfuge 0.5 ml tube containing 0.1 ml of bidistilled sterile water and vortexed vigorously. The mixture was boiling for 10 min to lyse the cells. The resulting cell lysate was briefly centrifuged in a Eppendorf model 5415C centrifuge. Supernatant, 35  $\mu$ l, were used as DNA sample for PCR. DNA amplification was done in a thermal cycler (Perkin-Elmer model 5400 Cetus, USA) by using conditions as well as the general and specific primers for *cryI* and *cryIII* (old classification) according to Ceron *et al.*, 1995. After amplification, 7  $\mu$ l samples from each PCR mixtures were electrophoresed on a 2.5% agarose gel in Tris-acetate-buffer at 100 V for 40 min and stained with ethidium bromide.

### Protein electrophoresis and immunodetection

*Bt* strains were grown on nutrient agar plates and incubated at 30°C until total sporulation. The spore-crystal mixtures were transferred to 1.5 ml tubes and thoroughly washed three times with 1 ml of bidistilled water. Protein analysis was done by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with 10% gels in a dual mighty small chamber (Hoeffer). One gel was stained with Coomassie and an identical gel was electrotransferred to nitrocellulose membrane. ICP immunodetection was carried out essentially as reported elsewhere (Sambrook *et al.*, 1989) by using different polyclonal antisera raised in rabbits against purified ICP of Cry3Aa, GM-33, and trypsin-activated toxic fragment of CryIAc. Phosphatase alkaline-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1/1000; Sigma) was used as secondary antibody, positive reaction were visualized with NBT and BCIP as substrates.

### Protein determination and $\beta$ -exotoxin production

Protein concentration were determined by the method of Lowry (1976) using bovine serum albumin as standard.  $\beta$ -exotoxin production was detected by Arevalo-Nino and Galan-Wong method (1994).

## Insect bioassays

*Bt* isolates were grown on a nutrient agar plates at 30°C for 5 days until total sporulation. Test for toxicity to lepidopteran *Trichoplusia ni* (Hubner) and *Heliothis virescens* (Fabricius) were conducted according Galan-Wong *et al.*, 1994, and for coleopteran insects the bioassays were conducted in a small bags (5) containing a mix of spore-crystals (500 µg/g diet) with 0.5 g of dried wheat flour. Each bag, was infested with 5 adults of the beetles *T. castaneum* (TC) and *O. surinamensis* (OS). The mortality (%) was scored after 8 days. Bioassays were carried out by triplicate.

## RESULTS

We collected samples of 5 granaries and we can be able to isolate 200 *Bt* colonies. Most samples were taken from very dry places and around one we observed several store grain pests such as *Sitophilus* sp. and many adults of TC and OS. Isolates were subject to microscopic examination and-PCR in order to know the *cry* type genes. DNA amplification was carried out with general and specific primers to *cryIII* genes and we selected only those isolates positives for putative ICP specific against coleopteran insects (data not shown). These isolates are identified with the key C9, GM-33, GM-80 and GM-83.

The results of SDS-PAGE reveals that all strains synthesize a protein of ca. 130 kDa (Fig.1A) and when they were electrotransferred to nitrocellulose, immunodetection revealed that they not cross-reacted neither with antisera against Cry3Aa nor anti GM-33 (Fig.1B and 1C).

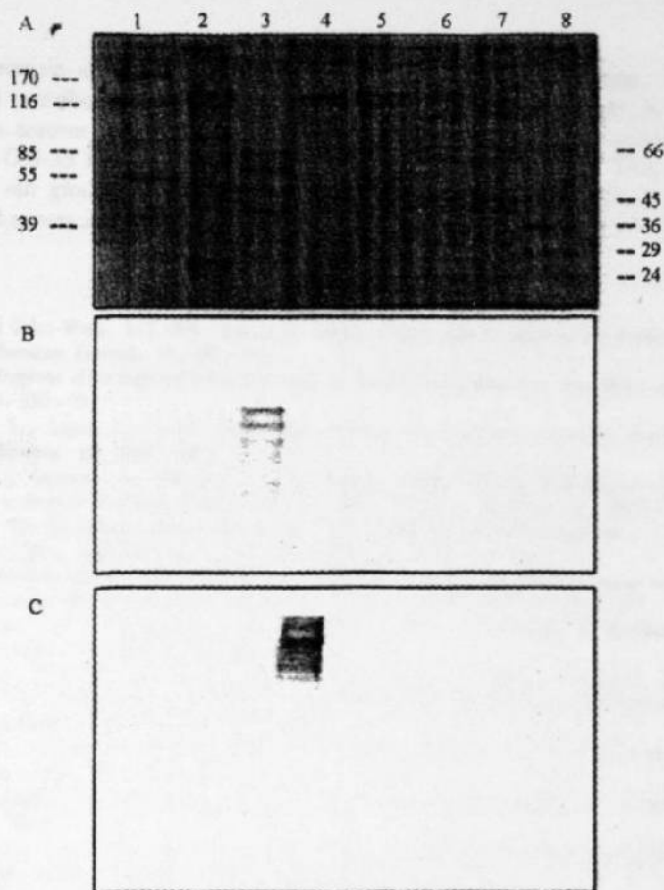
The toxicity evaluation showed that none isolate, except HD-3, were toxic against lepidopteran tested. Results with beetles showed that only GM-83 could be considered toxic to TC and C9 had a weak effect. However, when these strains were tested with OS, three isolates C9, GM-33 and GM-80 killed over 40% (Table 1). None isolated were positive for β-exotoxin production (data not shown). Strains were characterized for their H serotype and results show that GM-33 is serovar. *monterrey*, GM-80 *tohokuensis*, C9 *kumamotoensis* and GM-83 is *tochiensis*.

Table 1 Bioassays of *Bacillus thuringiensis* strains against lepidopteran and coleopteran<sup>a</sup>

Strains	Lepidopteran		Coleopteran	
	<i>T. ni</i>	<i>H. virescens</i>	TC	OS
Mortality (%)				
C9	-	-	20	48
GM-33	-	-	5	44
GM-80	-	-	-	46
GM-83	-	-	33	9
HD-73	100	100	1	1
<i>Bt</i> <sup>b</sup>	-	-	-	36
Control	-	-	2	1

<sup>a</sup> Mortality is expressed as mean of triplicate experiments.

<sup>b</sup> *Bt* var. *ambrosioides*.



**Fig. 1 SDS-PAGE and immunodetection of ICP from *Bt* toxic to coleopteran**  
 Lanes: 1 and 8, Molecular weight markers; 2, HD-73; 3, *Bt*; 4, GM-33; 5, C9; 6, GM-80; 7, GM-83.

## DISCUSSION

Currently, *Bt* isolates carrying ICP suspect to be toxic to coleopteran are tested against *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle) (McPherson *et al.*, 1988). This beetle has been controlled by different *Bt* strains belongs to different flagellar serovar., such as *morrisoni*, *tolworthi* and *kunamotoensis* (Rupar *et al.*, 1991). Although ICP from var. *tenebrionis* and *san diego* (serovar. *morrisoni*) have been tested against several beetles, their activity is only marginal and several toxicity results were not reproducible (Bauer, 1992; MacIntosh *et al.*, 1990). A significant finding of this research is the discovery that three isolates from Mexican samples were toxic to OS and one for TC, two coleopteran not controlled for several beetle-specific strains reported before such as *Bt* var. *san diego* against to TC (Hermstadt *et al.*, 1986). The biological activity of *Bt* ICP against coleopteran insects are, currently represented by isolates encoding for ICP around 70 kDa such as *Bt* var. *san diego*, *tenebrionis* (Hermstadt *et al.*, 1986; McPherson *et al.*, 1988); and another (Rupar *et al.*, 1991), but there are a Cry toxin with a molecular weight ca. 130 kDa toxic to coleopteran. Our results are agree with those reported for strains known as CryIIIc (formally Cry7A). Immunodetection results showed that ICP from our strains are not related neither *Bt* nor

among them, because antisera raised GM-33 not cross-reacted against any, except itself ICP. Another important contribution is that strains belonging another flagellar serotypes could be toxic to beetles, GM-33 is serovar. *monterrey*, GM-80 *taholuensis* and GM-83 is *tochuhierensis*. Is important highlighted that GM-33 is considered as holotype strain for this H group. This one is the third serotype isolated by our group, the first was serotype H-24 (*neolonensis*) (Rodriguez-Padilla *et al.*, 1990) and another was serovar. *mexicanensis* (Lecadet, 1994).

## REFERENCES

- Azevalo-Nino, K. and Galan-Wong, L.J. 1994. Uso de un metodo sencillo para la deteccion de  $\beta$ -toxinas en cepas de *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomol.* 19, 385 - 391.
- Bauer, L.S. 1992. Response of the imported willow leaf beetle to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on poplar and willow. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 330 - 331.
- Bravo, A., Sumbis, S., Lopez, L., *et al.* 1998. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4965 - 4972.
- Caron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guerrero, L., and Bravo, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3826 - 3831.
- Festeloni, J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family three. In "Advanced engineered pesticides". (L. Kim, Ed). pp. 63 - 72. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Galan-Wong, L.J., Sandoval-Coronado, C.F., Azevalo-Nino, K. *et al.* 1994. Evaluacion de cepas nativas y de coleocon de *Bacillus thuringiensis* serotipo H8 contra larvas de lepidopteros. *Southwestern Entomol.* 19, 301 - 307.
- Herrnstadt, G., Soares, G.G., Wilcox E.R., and Edwards, D.L. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *BioTechnology* 4, 305 - 308.
- Hilbe, H. and Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242 - 255.
- Kim, H.S., Lee, D.W., Woo, S.D. *et al.* 1998. Biological, immunological, and genetic analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from grassy in Korea. *Curr. Microbiol.* 37, 52 - 57.
- Lecadet, M. - M. 1994. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (Classified by H serotypes) International entomopathogenic *Bacillus oster*. Inst. Pasteur. Paris.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.
- MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Sims, S.R. *et al.* 1990. Specific and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invertebr. Pathol.* 56, 258 - 266.
- McPherson, S.A., Perlak, F.J., Fuchs, R.L. *et al.* 1988. Characterization of the coleopteran - specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *BioTechnology* 6, 61 - 66.
- Rodriguez-Padilla, C., Galan-Wong, L.J., de Berjac, H. *et al.* 1990. *Bacillus thuringiensis* subsp. *neolonensis* serotype H-24 a new subspecies which produces a triangular crystal. *J. Invertebr. Pathol.* 56, 280 - 282.
- Rupar, M.J., Donovan, W.P., Grant, R.G. *et al.* 1991. Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3337 - 3344.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2th edition. Cold Spring Harbor New York.
- Schoepf, E., Grichazere, N., van Rie, J. *et al.* 1998. *Bacillus thuringiensis* and its insecticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775 - 806.

# Isolation y Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* toxic against the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Oryzaephilus Surinamensis* (L.).

E. J. Sánchez- Alejo<sup>1</sup>; L. J. Galán- Wong; B. Pereyra- Alférez

Departamento de Microbiología Industrial y del Suelo; Laboratorio de Biología Molecular y Genética de Microorganismos. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León

## Abstract

The flour plagues are mainly composed by the flour red weevil, confuse beetle and the cereal's moth, this insects diminish the products quality giving it a bad odor and the presence of larvae and insects fragments: In this work we found three potential strains for the control of *Tribolium castaneum* and we have characterized them through the proteic profile,  $\beta$ -exotoxin production and insecticidal activity. The results show that the strains C9, GM80 and GM83 carry the gen *cryIII* which codifies a protoxina from c.a. 130 kDa and do not produce  $\beta$ -exotoxin.

Key Words: Flour, Beetle, *Bacillus thuringiensis*

In the industrialized countries, 20% of the agricultural products are destroyed by warehouse plagues, in third world nations these wastes can be in orders of 80% or more. The plagues in the stored foods belong mainly to two orders: Coleoptera (beetles and weevils) and Lepidoptera (moths). In the flour, the invaders are: the flour red weevil, confuse beetle and cereal moth.

---

<sup>1</sup> e-mail: ernsanchez@infosel.net.mx

The employment of chemical pesticides carries a high risk for the personnel and the ecosystem; as a result of this, the employment of biopesticides has grown as a safe alternative for the control of this kind of plagues (U.S. EPA, 1997)

An example of this is *Bacillus thuringiensis* (Bt), whose insecticidal activity is due to a paraesporal crystal of proteic nature called  $\delta$ - endotoxina or protein *cryIII*, which is toxic specifically against Lepidoptera, Diptera and Coleoptera likewise against Mites, nematodes and platelmints ( Feitelson, 1993 ).

Since 1993, some varieties of Bt are being employed for coleopter control in potato and tomato cultives ( *Tenebrio molitor* and *Leptinotarsa decemlineata* ).

In this work we found out three potential stains for controlling *Tribolium castaneum* in flour, the characterization of them has been through the proteic profile,  $\beta$ - exotoxin production and insecticidal activity.

Results show that strains C9, GM 80 and GM 83 carry the gen *cryIII* which codifies a protoxina of c.a. 130 KDa, toxic for the *Tc* and that don't produce  $\beta$ - exotoxin.

## Materials and methods

### Selection of Bt strains

We selected *Bacillus thuringiensis* strains that came from the semi-arid regions of Mexico and from stored grains, all of them belonging to the International Collection of the Department of Microbiology and Immunology of the Faculty of Biologic sciences of the UANL.

The strains of Bt were cultivated in Petri dishes during 12-16 Hrs, and then the samples taken from any colony were boiled during 10 minutes in 100  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O to lise the cells. Then they were centrifuged during 10 seconds to 10 000 rpm and 15 mil were taken from the overswimming to prepare the PCR. The general initiators for *cryIII* were used. The amplification of DNA was

made in a thermocycler model: Perkin-Elmer model 5400 Cetus. The reaction was made in a cycle of 2 min. to 95°C, followed by 30 cycles that consisted of 1 min to 95°C for the denaturalization, 1 min 48°C for the alignment, 1 min to 72°C for the extension and a last cycle of extension of 1 min to 72°C. From reaction products 15 µl were taken and a electrophoresis in a gel of agarose to 3% at 250 v was run Tris-Borato buffer to 250 v during 30 to 35 min. Finally they were dyed with bromide of etidio and 300 nm was observed in UV transiluminator to 300 nm. (Cerón *et al.*, 1995).

### **Toxin quantification**

Each one of the selected strains, were seeded in Petri dishes with nutritive agar and they were maintained to 37°C until esporulation (120 Hrs). The growth obtained with sterile distilled water was harvested. The mixture espora-crystal was washed twice with distilled water and was centrifuged to 12,000 rpm during 15 min to 4°C. The package thus obtained re-suspended in 500 µl of sterile H<sub>2</sub>O and the determination of total protein content was carried out by the method of Lowry *et al.* (1951) From each one of the selected strains 5 µl were taken and they were diluted in 195 µl of distilled water. In an alkaline solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> to 2% and NaOH 0.1 N the crystals were soluble in the presence of CuSO<sub>4</sub> and the reagent of diluted Folin was added. The samples were settled by 30 min. and their protein content was quantified when measuring its absorption to 750 nm in an spectrophotometer.

### **The Bioassay**

The design of the bioassay included modifications to the toxicity tests reported about *Tribolium castaneum* by Via. 1991, 1999; Hagstrum *et al.* 1998; Liu and Ho 1999. The toxic activity of the strains was proven in Petri dishes with 4 g of wheat sterile flour plus 5% of brewer's yeast as diet in each one of them. The mixture spore-crystal recovered in starch of maize. They were applied to 500 and 300 µg of toxin g<sup>-1</sup> of diet in the first and second bio-essay, respectively. Each strain was proved on 100 insects of *Tribolium castaneum*, distributed in 4 boxes with 25 adults of the same age. The environmental conditions of the bioessay were of 33°C and 70 % of relative



humidity. the adults were exposed to the toxin for 15 days, and then retired by means of a sieve were adults dead and alive were counted, in addition to alive larvae. Dead larvae were not counted because by their small size it was not possible to differentiate the dumb ones from other larvae. The adults and larvae were placed separately in other Petri dishes with new toxin to be exposed for 15 days. Finally they were counted: Number of adults alive and dead, and number of larvae, from where they had being placed only adults and from where initially were placed just alive larvae. Contingency tables were constructed and the results were analyzed by means of  $X^2$ .

#### Determination of the $\beta$ -exotoxin

The production of the  $\beta$ -exotoxin was made by means of the procedure of Arevalo-Niño and Galán-Wong, 1994. The strains were activated in nutritive agar by 24 h to 37°C and 50 ml inoculated of nutritive broth with each one of them, maintained in agitation to 150 rpm for 18 h. Afterwards, 2 ml of the respective inoculate was taken and they were transferred to 200 ml of media from Conner and Hansen. These were incubated in rotatory agitation to 150 rpm during 48 h to 37°C. The culture media were centrifuged to 10,000 RPM during 30'. To obtain the overswimming, the culture was sterilized to 120°C per minutes and filtrate to Milipore® membrane of 0.2 mm. Twenty mL were taken from the overswimming, it was concentrated by evaporation and precipitated with ethanol. The obtained precipitated was dissolved in distilled water and analyzed spectrophotometrically to 260 nm.

#### The purification of the protein crystal

The spore-crystal mixture was obtained after five days of incubation, when washing the growth obtained with distilled water. By centrifugation the mixtures were concentrated, they were washed with distilled water and were centrifuged 15 min. to 10,000 rpm twice. The crystals separated of the spores in the interphase of a phosphates buffer and polietilenglicol. The crystals obtained this way were conserved in refrigeration to -20°C until their use.

## The immunodetection of CryIII proteins

The purified crystals were put under SDS-PAGE to 10% (Smith 1984). These gels were run by duplicate in Hoeffer cameras. A gel was stained with blue of Coomassie and the other gel was transferred to nitrocellulose membranes. The immunodetection of proteins was made using different polyclonal antisera raised in rabbits against purified crystal protein of Cry3Aa, GM33 and trypsin-activated fragment of Cry1Ac. (Sambrook *et al.*, 1989). Phosphatase alkaline-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1/1000; Sigma) was used as secondary antibody, positive reaction were visualized with NBT and BCIP as substrates.

## RESULTS

### Selection of Bt strains harboring genes cryIII

Through PCR the presence of genes cryIII was determined in strains of our collection of Bt and colonies of isolated nonsporulated bacilli of insects died of *Tribolium castaneum*. The amplification of the DNA was made with general primers for *cryIII*; the waited for size of PCR products was of ca. 650 pb and agrees with reported by Cerón *et. al.* 1995 Figure 1. Ten strains of Bt were carrying from genes cryIII. All the strains are producers of crystalline inclusions. The sporulation and production of the protein crystal begins after 72 and reaches its maximum to 120h. the form of the insecticide crystal of the selected strains was bi-pyramidal and square only in the strain C9. Genes type cryIII had not being found in the nonsporulated bacilli.

Strains were characterized for their H serotype and results show that C9 is serovar. Kumamotoensis, GM80 tohokuensis and GM83 tochihiensis.

### Bioassays

The found percentage of mortality is in Table 1. Contingency tables were constructed. The results were analyzed by means of  $X^2$ . The strains that significantly limit the development of larvae towards adults were the GM79, GM83 and C9. The insecticide power was greater and

statistically significant in the stocks GM80, GM83 and C9. However, when these strains were tested with *Oryzaephilus surinamensis* (L), three strains C9, GM33 y GM80 killed over 40 percent.

Although the percentage of mortality is low, it is worth noting that the PCR technique is effective to detect those stocks with toxic activity against *Tc* and that it is possible to increase this value until acceptable commercial levels when there are other attractive supports of the toxin for the insect. Carozzi and col. (1991) conclude that the predicted insecticide activity through PCR corresponds with that found in the bioassays. On the other hand Singh and Hori (1979) found a variable percentage of mortality in adults of *Tc* and they argue additionally that the powder form of the bacterial strains seem to be more effective against coleopters.

#### Determination of the $\beta$ -exotoxin.

The absorption spectrum of the originating ethanol precipitated ones of the strains, GM-80, GM-83 and C-9 with those obtained of stock HD59 (positive control) and HD1 (negative control) were compared by means of a sweeping to 250, 260, 270 nm, and as an adjustment negative control, distilled water was used. In the three cases maximum absorption appeared to 250 nm. The positive control (HD59) presented the highest value; the stocks Btt, GM-80, GM-83 and C-9 presented lower values than the target and that the negative control (HD1). The results show production of  $\beta$ -exotoxin in stock HD53 and agree well those reported by Arevalo and Galán in 1994. According to the results obtained, the stocks Btt, GM80, GM83 and C9 do not produce  $\beta$ -exotoxin, which may allows its use as possible agents of biological control of insects without risk to human health.

#### Electrophoresis and immunodetection

The results (Figure 2) show that all the selected strains synthesize a protein of c.a. 130 kDa. When these were electro-transferred to nitrocellulose membranes, immunodetection revealed that they not cross-reacted neither with antisera against Cry3Aa nor anti GM33.

## DISCUSSION

They are some reports of the control that *Bacillus thuringiensis* exert over some kind of coleopters like *Leptinotarsa decemlineata* (Donovan 1988, Mac Intosh 1990, Rupar 1991, Zehnder 1992); *Diabrotica undecimpunctata* (Rupar 1991), *Tenebrio molitor* (Chilcott 1993); *Tribolium confusum* (Singh 1979, Arthur 1994); *Tribolium castaneum* (Singh 1979), with different mortality rates due to the variation in the experimental conditions in which the bioassays are being conducted and the differences among the insects species.

In this work we reported three strains that can be potentially used to control the flours red weevil, with a mortality of 33 % for the strains GM-80 and GM-83; and 20 % for the strain C-9, although, the toxins mixture with alimentary stimulants to increase the consume of Bt, could increase its toxic effect. By other side, there exist reports related with the employment of mutations in the CryIII protein structure, with the possibility to increase it toxic effect over choleopters like *Tenebrio molitor* and *Leptinotarsa decemlineata* (Wu et al. 1996).

Due to the bioessay design, the mortality was registered 15 days after the application of the mixture spore-crystal, although, it is possible that the toxic effect were present in a shorter time. Singh and Hori (1979), registered variable percentages of mortality with *Tribolium* adults in less than 14 days and established that the powder form of the bacterial strains seems to be more effective against the beetle, this results are consistent with ours.

Some kinds of Coleopters are being controlled with different stains of Bt and are being identified according with the flagellar serotype like *thuringiensis*, *aizawai*, *kurstaki*, and *soto* (Singh 1979); *tenebrionis* (Krieg et al. 1983); *san diego* (Herrnstadt et al. 1986); *tholworthi* (Sick et al. 1990, Rupar et al. 1991); *morrisoni* (Rahrdja 1995); *kumamotoensis* (Rupar et al 1991).

The serotypes to whom the selected strains in this work belong are, *kumamotoensis*, (C-9), *tohokuensis* (GM-80) and *tochihiensis* (GM 83).

The results show that the selected strains in this work carry genes that belong to the family *cryIII* but do not correspond to anyone of the specific genes described by Ceron et al 1995. These results show the presence of strains that can carry potentially new *cry* proteins and constitute a potential alternative for the biologic control of flour plagues without risk for the ecosystem and human health.

### Conclusions:

- By means of the use of general primers for the gene *cryIII* the strains GM-80, GM-83 and C-9 were selected. Using specific primers to identify the genes of the family *cryIII*, none of these strains presented positive reaction to the PCR.
- The strains that significantly limit the development of larvae towards adulthood were the GM-79, GM-83 and C-9. The insecticide power was greater and statistically significant in the strains GM-80, GM-83 and C-9.
- The strains selected do not produce  $\beta$ -exotoxin, which allows its possible use as agents of biological control of insects.

### REFEFRENCES

- Arévalo-N, K y L.J. Galán-W. 1994. Uso de un método sencillo para detección de  $\beta$ -exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*. Southwestern Entomologist. 19(4), 385-391.
- Arthur, F.H. y S.L. Brown. 1994. Evaluation of diatomaceous earth and *Bacillus thuringiensis* formulations for insect control in stored peanuts. J. Entomol. Science **29**, 176-182.
- Carozi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S.Evola & Koziel M.G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3057-3061.

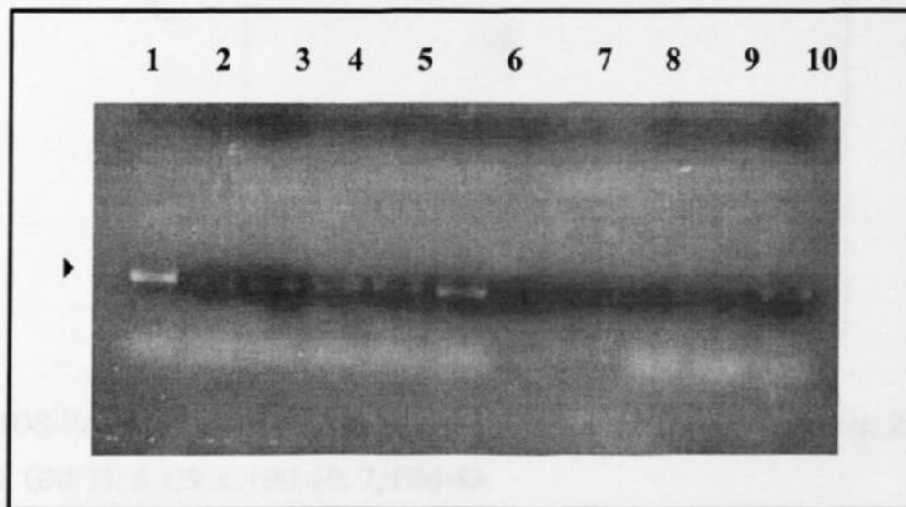
- Cerón, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca y A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3826-3831.
- Chilcott, C.N. y P.J. Wigley. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* 61 : 244-247.
- Donovan, W.P., J.M. Gonzalez Jr., M.P. Gilbert y C. Dankocsik. 1988. Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequences of the toxin gene. *Mol. Gen. Genet.* 214, 365-372.
- Feitelson, J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family three. In “ Advances engineered pesticides” (L. Kim, Ed). pp 63 – 72 Marcel Dekker, Inc., New York.
- Herrnstadt, C., T.E. Gilroy, D.A., Sobieski, Bennett, B.D. & Gaertner, F.H. 1987. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene* 57, 36-46.
- Liu, Z. L. & Ho, S. H. 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of stored products research* 35, 317-328.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J, Farr A.L., R.J., Randall. 1951. Protein measurment with the Folin phenol reagen. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, S.R. Sims, P.L. Hunst, J.T. Greenplate, P.G. Marrone, F.J. Perlak, D.A. Fischhoff y R.L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invertebr. Pathol.* 56, 258-266.

- McPherson, S.A., Perlak, F.J., Fuchs, R.L. 1988. Characterization of the coleopteran-specific protein gene of the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Bio/Technology* 6, 61-66.
- Norma Oficial Mexicana 147. Diario Oficial de la Federación. Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos.
- Rupar, M.J., W.P. Donovan, R.G. Groat, A.C. Slaney, J.W. Mattison, T.B. Johnson, J.F. Charles, V.C. Dumanoir y de Barjac H. 1991. Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3337-3344.
- Singh, D.R. y K. Hori. 1979. A laboratory study of effectiveness of certain bacteria on storage pests. *Research Bulletin of Obihiro University Series 1* 11 : 463-468.
- Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J. D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806.
- Via, S. 1991. Variation between strains of the flour beetle *Tribolium castaneum* in relative performance on five flours. *Entomologia exp. Apl.* 60, 173-182.
- Via, S. 1999. Cannibalism facilitates the use of a novel environment in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Heredity* 82, 267-275.
- Wu, S.J. and D.H. Dean. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII $\delta$ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255, 628-640.
- Zehnder, G.W., G.M. Ghidui y J. Speese III. 1992. Use of the occurrence of a peak colorado potato beetle ( Coleoptera: Chrysomelidae) egg hatch for timing of *Bacillus thuringiensis* spray applications in potatoes. *J. Econ. Entomol.* 85, 281-288.

**Table 1.** Mortality\* of *Tribolium castaneum* (Tc) and *Oryzaephilus surinamensis* (Os) by *Bacillus thuringiensis* strains.

Cepa	Tc	C.V.	Os	C.V.
GM-80	33	5.90	46	8.16
GM-83	33	7.68	9	7.83
C-9	20	7.95	48	8.19

\* means of three bioassays; C.V. Coefficient of variation



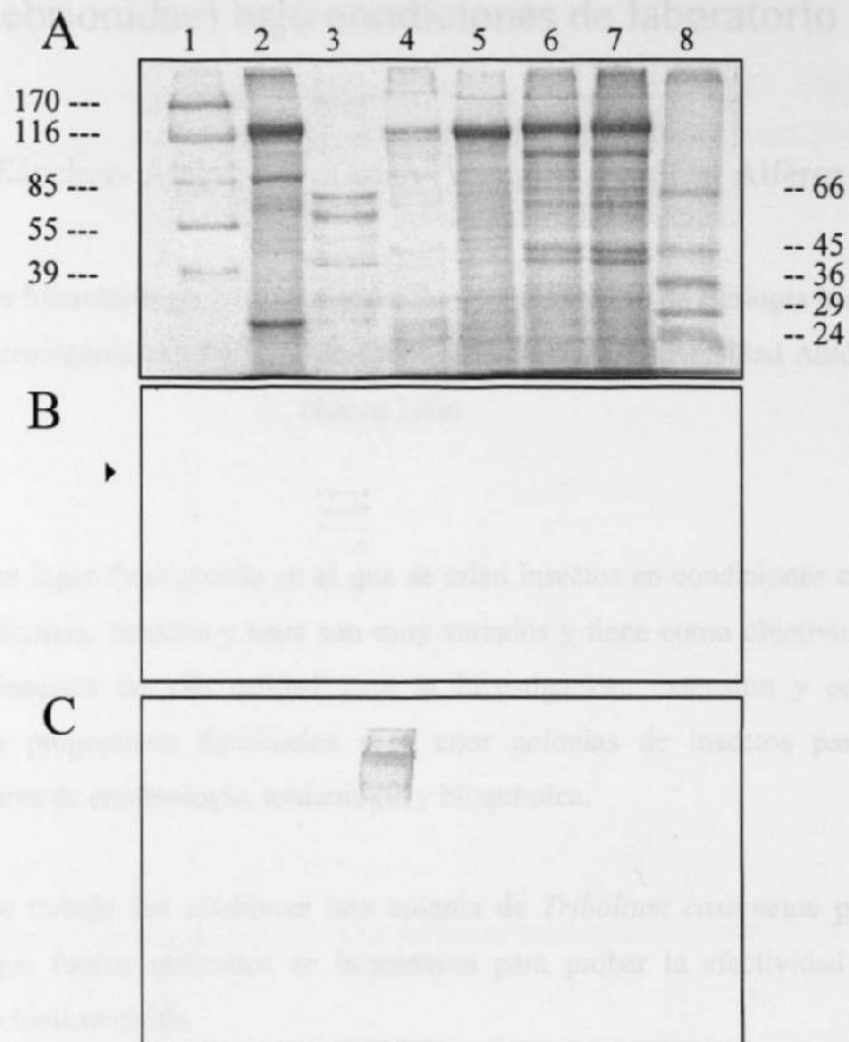
**Figure 1.** PCR results of several strains of *Bacillus thuringiensis*

Line 1, GM-79; 2, GM-80; 3, GM-83; 4, JM-1; 5, JM-2; 6, C-9; 9, GM-78; 10, GM-43; 11, Btt.



El cultivo de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera:

Tenebrionidae) en condiciones de laboratorio



**Figure 3.** SDS-PAGE of cristal proteins of Bt. Lines 1 y 8 molecular markers; 2, HD-73; 3, Btt; 4, GM-33; 5, C9; 6, GM-80; 7, GM-83.

Muchos de los productos alimentarios como cereales, harvencillos de insectos plaga. Entre ellos *Tribolium castaneum* es de gran importancia, debido a que es común encontrarlo en granos secos y en productos alimentarios almacenados, particularmente cereales procesados como la harina, mezcla para panes, palmas, diversos para mascotas y especies. Otros artículos frecuentemente infestados son el cacao, nueces y semillas, incluidas las granos y alimento para peces. En los alimentos almacenados es difícil apreciar a simple vista harvencillos y larvas de insectos, en

# El cultivo de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) bajo condiciones de laboratorio

E. J. Sánchez- Alejo<sup>1</sup>; L. J. Galán- Wong; B. Pereyra- Alférez

Departamento de Microbiología Industrial y del Suelo; Laboratorio de Biología Molecular y Genética de Microorganismos. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León

Un Insectario, es un lugar determinado en el que se crían insectos en condiciones controladas o de cautividad, las formas, tamaños y usos son muy variados y tiene como objetivo producir un gran numero de insectos de alta calidad para la investigación, extensión y educación. El Insectario también proporciona facilidades para criar colonias de insectos para proyectos individuales en el área de entomología, toxicología y bioquímica.

El objetivo de este trabajo fue establecer una colonia de *Tribolium castaneum* para producir larvas y adultos que fueron utilizados en bioensayos para probar la efectividad de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida.

## **Importancia de *Tribolium castaneum* en los alimentos almacenados**

Muchos de los productos alimenticios secos contienen huevecillos de insectos plaga. Entre ellas *Tribolium castaneum* es de gran importancia, debido a que es común encontrarlo en granos secos y en productos alimenticios almacenados, particularmente cereales procesados como la harina, mezcla para pasteles, galletas, alimento para mascotas y especies. Otros artículos frecuentemente infestados son el chocolate, nueces y semillas, incluidas la granola y alimento para pájaros. En los alimentos almacenados es difícil apreciar a simple vista huevecillos y larvas de insectos, sin

embargo si estos productos se almacenan mas de cuarenta días es fácil encontrar la presencia de adultos.

Es posible confundir a *Tribolium castaneum* con *Tribolium confusum*, no obstante existen algunas diferencias morfológicas y de comportamiento que permiten distinguirlos

El gorgojo castaño de la harina (*Tribolium castaneum*)y el gorgojo confuso de la harina (*Tribolium confusum*)son muy similares en apariencia y hábitos. Los adultos de este último presentan las antenas gradualmente elongadas y terminadas en punta; las antenas del gorgojo castaño de la harina presentan los últimos tres segmentos abruptamente mas grandes. T confusum no puede volar pero T castaneum si lo hace

La presencia de estos insectos o fragmentos de ellos determina una mala calidad del producto y la consecuente penalización sobre el precio, en el mejor de los casos. La norma oficial mexicana establece que en harinas la presencia de sustancias extrañas debe ser de menos de 50 fracciones de insectos y menos de 5g de excretas de roedor por cada diez kg.

### **El ciclo de vida de *Tribolium castaneum***

El gorgojo castaño de la harina presenta un ciclo de vida con diferentes fases de crecimiento: huevecillo, larva, pupa y adulto. El desarrollo, sobrevivencia y producción de huevecillos depende de una dieta adecuada y de las condiciones ambientales. Ambos factores también determinan los sitios de apareamiento y de oviposición del insecto. A través de la cría de insectos es posible conocer el tiempo en que se completa su ciclo de vida y predecir el crecimiento de la población (Hagstrum *et al.* 1995).

Los huevecillos son muy pequeños de color blanco claro y pegajosos, a menudo se encuentran cubiertos de harina o de otros alimentos e incuban en 5 a 12 días. La hembra puede ovipositar cerca de 1000 huevecillos

Las larvas pueden alcanzar su completo desarrollo en uno a cuatro meses, dependiendo de la temperatura y tipo de alimento; su longitud puede ser aprox. de 0.4 cm. Las pupas son blancas desnudas y permanecen en este estadio una semana aproximadamente. El adulto es alargado de 0.35 cm. de largo aprox. y de color café-rojizo. *Tc* completa su ciclo de vida en 37 días en promedio y puede vivir mas de tres años .

### **Efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento del insecto**

Las preferencias de temperatura de los insectos son importantes debido a su incapacidad para regular la temperatura corporal, de tal forma que este factor ambiental determina el tiempo de desarrollo, la fecundidad y la tasa de crecimiento poblacional. Los adultos de *Tc* prefieren temperaturas alrededor de los 30°C (Langer y Young, 1976). A esta temperatura el tiempo de desarrollo es corto, la tasa de fecundidad y de crecimiento poblacional son altas. Donahaye, E. *et al.*, (1996) encontraron temperaturas adecuadas de desarrollo a 35°C .

Se han encontrado diferencias en la temperatura que prefieren los adultos de *Tc* en función del sexo; las hembras son menos dinámicas y prefieren lugares mas frescos que los machos. El movimiento de los machos hacia lugares tibios se explica por su habilidad para detectar el calor con el tercer segmento de sus antenas (Hagstrum et al. 1998). Las bajas temperaturas también limitan el desarrollo del insecto, el adulto muere a 0°C y la pupa a -18°C.

El efecto de la humedad del grano lo han estudiado Fields y Korunic (2000) y encontraron que a medida que disminuye el contenido de humedad aumenta la mortalidad. El contenido de humedad en grano y harina donde se desarrolla mejor *Tc* es del 12.5% Rentería-Gutierrez et al. (2000).

### **Efecto de los factores nutricionales sobre el crecimiento del insecto**

*T. castaneum* utiliza los aromas volátiles del grano para distinguir si los granos de los cereales almacenados están dañados mecánicamente o por otros insectos (Trematerra *et al.*, 2000). Puede

crecer en grano entero de trigo, hasta completar su ciclo de vida, sin embargo el crecimiento de la población es mas alto cuando se cultiva en harina de trigo (Via, 1991).

Rentería-Gutierrez et al. (2000) encontraron que un numero reducido de adultos de *T. Castaneum* resultó cuando estos se criaron sobre grano entero, pero una alta densidad de adultos se presentó cuando estos se criaron en harina, incluso de diferentes variedades de trigo. También establecen que el contenido de proteína total y las características físicas no tuvieron una influencia significativa sobre el crecimiento poblacional de esta especie.

Cuando *Tc* se crió sobre muestras de harina procedentes de diferentes variedades de trigo comercial se encontró fuerte correlación entre el contenido total de almidón vs. el numero de de larvas y adultos. Hagstrum et al. (1998) han logrado mantener la cría de insectos por varias generaciones con una dieta a base de harina de trigo y 5% de levadura de cerveza a 36°C y 70% de humedad relativa.

### **Establecimiento de la cría de *Tribolium castaneum***

Existen amplias descripciones acerca del equipo e infraestructura para cultivar *Tribolium castaneum* (Via, S., 1991; Rentería-Gutierrez, *et al.*, 2000; Trematerra, P. *et al.*, 2000; Mohan, S. *et al.*, 2002), sin embargo su diseño depende mas del ingenio y de la disponibilidad de recursos para establecer la cría.

Es importante que los insectos incluidos en los bioensayos sean de la misma edad. Esto permite atribuir las causas de muerte a una sola fuente de variación y descartar la muerte por otras causas. En este sentido también será posible cuantificar la mortalidad natural del insecto bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

El establecimiento de la cría se realizó en dos fases: La primera tuvo por objetivo el incremento del número de insectos y la segunda producir insectos de la misma edad.

En la primera fase se utilizó maíz como medio inicial de cultivo. Este se inspeccionó visualmente y grano por grano para tener la seguridad que no estaban presentes otras plagas. El grano seleccionado, se trituro y con él se llenaron 2 frascos de vidrio de 3 l: Dos días después se colocaron los insectos y se cubrieron los recipientes con tapa metálica, La tapa tenia una malla de una pulgada cuadrada que permitia el intercambio de aire hacia el interior.

Los frascos se ubicaron por espacio de dos meses en un lugar oscuro, a temperatura de 33° C en promedio y humedad relativa del 70% aproximadamente. No se presentó crecimiento fúngico durante esta fase.

En la segunda fase, se probaron maíz quebrado, harina de trigo y harina de trigo integral como medios de cultivo, estas dos ultimas adicionadas con 5% de levadura de cerveza. Se esterilizaron los dos tipos de harina en autoclave a 120°C, 15 min. y 15 libras de presión con la finalidad de evitar la presencia de huevecillos y larvas de otras plagas. Se permitió un tiempo de cinco días para equilibrar el contenido de humedad de la harina con el ambiente, manteniendo los frascos a 33° C en promedio.

Los medios de cultivo se dispusieron en frascos de vidrio de 3 litros de capacidad. En cada frasco se colocaron 200 adultos de *Tribolium castaneum*, y se dejaron en contacto por espacio de quince días. Posteriormente se retiraron los insectos.

El efecto de los medios de cultivo se evaluó contando el numero de larvas y adultos, así como los días transcurridos a la producción de adultos. Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro No. 1 Ciclo de vida, numero de larvas y de adultos de <i>Tribolium castaneum</i> desarrollados en diferentes medios de cultivo.			
Medio de cultivo	No. de larvas	No. de adultos	Ciclo de vida (días)
Maíz quebrado	362	136	39
Harina de trigo mas 5% de levadura de cerveza	626	205	33
Harina de trigo integral	523	159	35

El crecimiento de *Tc* fue mayor en el medio de cultivo que contenía harina de trigo mas 5 % de levadura de cerveza y en harina de trigo integral. La cría del insecto en maíz quebrado determinó mayor ciclo de vida y menor numero de larvas y adultos. Estos resultados son consistentes con los reportados por Rentería-Gutierrez et al. (2000), donde establecen que la tasa de oviposición y de emergencia de adultos del gorgojo castaño de la harina fue menor en grano quebrado. Al parecer la harina de trigo adicionada con 5% de levadura de cerveza es el mejor medio de cultivo para *Tc*, debido al menor ciclo de vida y el mayor numero de larvas y adultos.

## **Perspectivas de la cria de insectos**

La cría de insectos permite apoyar la investigación en los siguientes aspectos:

- Estudiar a nivel celular el mecanismo de acción de las toxinas, así como la presencia de enzimas intestinales del insecto que pudieran incrementar el efecto tóxico.
- Monitoreo de plagas a través de medios no convencionales.
- Evaluar la resistencia del insecto hacia los insecticidas químicos y biológicos
- En el ámbito de la medicina es posible estudiar las reacciones alérgicas al insecto

## **REFERENCIAS**

- Donahaye, E.J.; Navarro, S.; Rindner, M. 1995. Low temperature as an alternative to fumigation for desinfecting dried fruit from three insect species. *Journal of stored products research*. 31(1): 63-70.
- Donahaye, E.J.; Navarro, S.; Rindner, M.; Azrieli, A. 1996. The combined influence of temperature and modified atmospheres on *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of stored products research*. 32(3): 225-232.

- Dowdy, A.K. 1999. Mortality of red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) exposed to high temperature and diatomaceous earth combinations. *Journal of stored products research*. 35 (2): 175-182.
- Fields, P. and Korunic, Z. 2000. The effect of grain moisture content and temperature on the efficacy of diatomaceous earth from different geographical locations against stored-product beetles. *Journal of stored products research*. 36(1): 1-13.
- Huang, Y. and Ho, S.H. 1998. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of stored products research*. 34(1): 11-17.
- Huang, Y.; Tan, J.M.W.L.; Kini, R.M. and Ho, S.H. 1997. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of stored products research*. 33(4): 289-298.
- Mohan, S. and Fields, P.G. 2002. A simple technique to assess compounds that are repellent or attractive to stored-product insects. *Journal of stored products research*. 38(1): 23-31.
- Pittendrigh, B.R.; Huesing, J.E.; Shade, R.E. and Murdock, L.L. 1997. Effects of lectins, CRY1A/CRY1B B $\delta$ -endotoxin, PAPA, protease and  $\alpha$ -amylase inhibitors, on the development of the rice weevil, *Sitophilus oryzae*, using an artificial seed bioassay. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 82(2): 201-211.
- Rentería-Gutiérrez, T.R., Moreno-Martínez, E. And Barrón-Hoyos J.M. 2000. Population growth of *Rhizoperta dominica* (F) and *Tribolium castaneum* (H) in different wheat varieties and groups commercially produced in Sonora, México. *Southwestern Entomologist*. 25(3): 213-220.



- Trematerra, P.; Sciarreta, A. And Tamasi, E. 2000. Behavioural responses of *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* to naturally and artificially damaged durum wheat kernels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 94(2): 195-200.
- Via, S. (1991). Variation between strains of the flour beetle *Tribolium castaneum* in relative performance on five flours. *Entomologia exp. Apl.* 60, 173-182.
- Via, S. (1999). Cannibalism facilitates the use of a novel environment in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Heredity* 82, 267-275.



