

Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias

I. RUIZ DE ESCUDERO, I. IBÁÑEZ, M. A. PADILLA, A. CARNERO, P. CABALLERO

Bacillus thuringiensis es una bacteria cosmopolita que puede ser aislada fácilmente a partir de muestras de suelo y otros muchos substratos. Su característica más importante es la capacidad de producir proteínas con toxicidad específica para insectos de las que actualmente se conocen más de 250 holotipos. Es el microorganismo entomopatógeno más utilizado como bioinsecticida en el control de plagas y ha dado lugar a la selección de algunos biotipos resistentes en condiciones de campo. La identificación y caracterización de nuevas proteínas Cry de *B. thuringiensis* es de interés ya que puede contribuir, por un lado, a ampliar el espectro de huéspedes de esta bacteria y, por otro, a disponer de alternativas en los casos de resistencia. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la diversidad de los aislados de *B. thuringiensis* procedentes de muestras de suelo de las Islas Canarias e identificar cepas que produzcan proteínas Cry distintas a las conocidas. Para ello se analizaron 306 muestras de tierra que fueron recogidas en distintos puntos de las islas del archipiélago canario. De estas muestras se obtuvieron un total de 684 nuevos aislados. Las proteínas del cristal paraesporal de los distintos aislados se analizaron en SDS-PAGE definiéndose el perfil proteico característico de cada uno de ellos. Los perfiles de algunos de estos aislados presentaban una banda proteica de alrededor de 100 kDa. Paralelamente el análisis del contenido génico mediante PCR demostró que dichas cepas no contienen ninguno de los genes *cry1*, *cry2* o *cry9*, con conocida actividad insecticida para lepidópteros. Sin embargo, algunas de estas cepas tienen una elevada actividad insecticida contra distintas especies de lepidópteros (*Helicoverpa armigera*, *Lobesia botrana*, *Spodoptera exigua*, *S. littoralis*, *S. frugiperda* y *Trichoplusia ni*) lo cual sugiere que dichas cepas producen nuevas proteínas Cry.

I. RUIZ DE ESCUDERO, I. IBÁÑEZ, P. CABALLERO. Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona (Navarra). pcm92@unavarra.es
M. A. PADILLA, A. CARNERO. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apartado 60, La Laguna, 38200 Tenerife (Islas Canarias)

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, aislados, Islas Canarias, proteínas Cry, toxicidad, Lepidoptera, bioensayo.

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis es una bacteria ampliamente distribuida por todo el mundo y ha sido aislada a partir de muestras de suelo (MARTIN y TRAVERS, 1989; IRIARTE *et al.*, 1998), polvo de productos almacenados (DE LUCA *et al.*, 1982; MEADOWS *et al.*, 1992; IRIARTE *et al.*, 1998), ambientes acuáticos (GOLDBERG y MARGALIT, 1997; IRIARTE *et*

al., 2000), insectos (HEIMPEL, 1967; KAELEN *et al.*, 1994), hojas de plantas (SMITH y COUCHE, 1991) y otros hábitats. La amplia distribución de *B. thuringiensis* puede deberse a que no es un verdadero microorganismo entomopatógeno, y actualmente se desconoce su verdadero papel ecológico, por lo que probablemente puede ajustarse mejor a la definición de un patógeno oportunista (SCHNEPF *et al.*, 1998).

B. thuringiensis es una bacteria aerobia, Gram positiva, con capacidad para formar endoesporas de resistencia que pueden permanecer activas en el suelo largos periodos de tiempo. Sus células vegetativas tienen forma bacilar y poseen flagelación peritrica. Pertenecen a la familia Bacillaceae y se diferencian de otras bacterias, como *Bacillus cereus*, por la capacidad para formar durante la fase de esporulación una o más inclusiones cristalinas de naturaleza proteica (WHITTELEY y SCHNEPF, 1986). Estos cristales paraesporales son detectables al microscopio óptico de contraste de fases y pueden estar constituidos por la agregación de una o varias proteínas, denominadas proteínas Cry o δ -endotoxinas, que resultan tóxicas de forma selectiva al ser ingeridas por insectos susceptibles, entre los que se incluyen importantes plagas agrícolas (MACINTOSH *et al.*, 1990). Las proteínas Cry se disuelven en el mesenterón de los insectos debido a las condiciones básicas del mismo y actúan creando poros en su membrana que provocan un desequilibrio osmótico, lisis celular y, finalmente, la muerte del insecto (ESCRICHE y FERRÉ, 2001).

Las proteínas Cry están codificadas por los denominados genes *cry*, que se encuentran mayoritariamente en megaplásmidos, y, con menor frecuencia, en el cromosoma de la bacteria. Hasta la fecha se han caracterizado unas 240 proteínas Cry distintas que se han clasificado en 43 familias y varios subgrupos dentro de cada familia (CRICKMORE *et al.*, 1998) (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html). Las proteínas Cry tienen propiedades insecticidas características para cada una de las especies de insectos que están dentro de su espectro de huéspedes el cual también es característico para cada proteína insecticida. Las proteínas con actividad insecticida para las especies del orden Lepidoptera se encuentran clasificadas en las familias Cry1, Cry2, y Cry9 (SCHNEPF *et al.*, 1998).

B. thuringiensis posee una elevada especificidad y no produce residuos tóxicos, lo cual ha favorecido su desarrollo como bioin-

secticida. Estos productos han sido ampliamente utilizados para el control de plagas de lepidópteros durante los últimos 40 años (NAVON, 2000). Sin embargo, el uso sistemático de los bioinsecticidas Bt contra algunas especies ha propiciado el desarrollo de resistencias contra algunas de las proteínas Cry que constituyen el principio activo. El primer caso de resistencia en campo fue el de *Plutella xylostella* (FERRÉ *et al.*, 1991), lo que indujo a muchos investigadores a tratar de determinar los mecanismos y las bases genéticas de resistencia a esta bacteria y a sus toxinas (FERRÉ y VAN RIE, 2002).

En los últimos años se han establecido un importante número de colecciones de *B. thuringiensis* en distintas partes del mundo con la finalidad de encontrar cepas que produzcan nuevas proteínas Cry con mayor potencia insecticida o un espectro de huéspedes más amplio que las actualmente conocidas. Con este mismo objetivo, en este estudio se ha analizado una colección de aislados de *B. thuringiensis*, obtenidos a partir de muestras de suelo procedentes de las islas occidentales del archipiélago canario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de tierra. Las muestras de suelos se recogieron en prospecciones de campo realizadas en la provincia de Santa Cruz de Tenerife que incluyó a las islas de Tenerife, La Palma, La Gomera y El Hierro. Se tomaron muestras tanto de suelos de hábitats naturales como de suelos cultivados, incluyendo los diferentes estratos de vegetación presentes en las islas, así como los cultivos más representativos en la actualidad (platanera, tomate y vid). En cada punto de muestreo, con un área estimada de 9 m², se tomaron 6 submuestras, en una superficie de 0,10 m² cada una, que se mezclaron, para obtener 1 kilogramo de suelo, que posteriormente era acondicionado y tamizado. Se desechó la capa de materia orgánica sin descomponer y se recogió suelo hasta 20 cm de profundidad. El número de muestras de suelo recogidas fue de 30

para la isla de El Hierro, 25 para La Gome-
ra, 60 para La Palma y 188 para Tenerife.

Aislamiento e identificación de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis*. De cada una de las 306 muestras se tomó 1 g que fue mezclado con 10 ml de agua estéril en tubos de ensayo y sometido a agitación vigorosa. Con el objeto de seleccionar las esporas presentes en la mezcla, los tubos se incubaron en un baño a 70°C durante 30 min. Seguidamente, se volvieron a agitar los tubos y tras un breve reposo se tomaron dos alícuotas de 5 y 10 μ l que se sembraron en sendas placas de Petri con medio esporulante CCY (STEWART *et al.*, 1981). Tras una incubación de 72 h a 28°C se examinaron las colonias crecidas, seleccionándolas por su aspecto y morfología a simple vista. Las colonias de *B. thuringiensis*, se distinguen por su contorno irregular, color blanco con cierta tonalidad grisácea y textura lisa y cerosa en el centro y más mate en los bordes. Esta identificación preliminar de las colonias fue confirmada por observación de células al microscopio óptico de contraste de fases y definitivamente seleccionadas por la presencia de un cristal paraesporal birrefringente. De cada aislado identificado se obtuvo una mezcla de esporas y cristales que fueron congeladas a -20°C en glicerol al 50 % para su conservación.

Producción y purificación de cristales. Las cepas de *B. thuringiensis* se hicieron crecer según las condiciones y el medio de cultivo descrito en ESCRICHE *et al.* (2001). Para la obtención de cristales puros cada cepa de *B. thuringiensis* se creció un volumen de 0,5 l de CCY. Al cultivo crecido se le añadieron 100 ml de 5M NaCl y se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm y 4°C en una centrífuga Centrikon T-124. La mezcla de esporas y cristales se lavó con agua bidestilada y se repitió el lavado y centrifugado dos veces más. La mezcla de esporas y cristales se resuspendió en 15 ml de agua bidestilada estéril y se sometió a sonicación durante 45 s (Soniprep 150, MSE). La suspensión de esporas y cristales se cargó sobre un gra-

diente discontinuo de sacarosa, formado por 13 ml al 79 % (p/v) y 15 ml al 67 % (p/v), y se centrifugó durante 16 h, a 25.000 rpm y 4°C (ultracentrífuga Centrikon T-1080). Los cristales se recuperaron mediante una pipeta Pasteur, se lavaron dos veces en agua bidestilada, y se almacenaron a 4°C como suspensiones acuosas. Para determinar la cantidad de proteína obtenida se solubilizó una alícuota de cristales en tampón carbonato 50 mM pH 11.3, se incubó a T ambiente durante 1 h en agitación constante y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. Se extrajo el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método descrito por BRADFORD (1976).

Caracterización bioquímica de los aislados de *B. thuringiensis*. La caracterización bioquímica de las cepas se realizó mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). A 20 μ l de la mezcla de esporas y cristales se añadieron 10 μ l de 187,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 6% SDS; 30% glicerol y 0,03% bromophenol blue y DTT 0,1 M. La mezcla, se introdujo en un baño a 100°C durante 10 min. Seguidamente las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se cargó en un gel de SDS-PAGE al 9% (34,5:1 acrilamida-bisacrilamida) y se sometió a una intensidad constante de 36 mA durante 1 h y 30 min.

El gel fue teñido en una solución 50% (v/v) de etanol, 10% (v/v) de ácido acético y 0,1% de azul de Coomassie R250 durante 40 min. El colorante no fijado se eliminó con una solución 6,75 % (v/v) de ácido acético glacial y 9,45% (v/v) de etanol. Los geles obtenidos se fotografiaron mediante un sistema de captación digital de imagen (Chemidoc, Biorad) y seguidamente, se secaron y almacenaron.

Detección de genes *cry* mediante PCR. Para la obtención del DNA total de cada aislado se hirvió durante 10 min en 100 μ l de agua Milli Q una colonia crecida en una

Cuadro 1: Secuencias de los pares de cebadores específicos y generales utilizados para la identificación de los genes *cry1*, *cry2* y *cry9*.

Gen	Secuencia del cebador	Fragamento amplificado (pb)	Referencia
<i>cry1</i>	CTGGATTACAGGTGGGGATAT	543-558	(BRAVO <i>et al.</i> , 1998)
general	TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT		
<i>cry2</i>	GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG	689-701	(BEN-DOV <i>et al.</i> , 1997)
general	CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT		
<i>cry9</i>	CGGTGTTACTATTAGCGAGGGCGG	354	(BEN-DOV <i>et al.</i> , 1999)
general	GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC		

placa sembrada la noche anterior. Para cada reacción de PCR se preparó una mezcla compuesta por 5 µl de solución de DNA, 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Pharmacia Biotech), 2,5 µl del buffer de la enzima, 0,25 mM de cada uno de los cuatro nucleótidos trifosfato y 1 µM de cada uno de los cebadores, en un volumen final de 25 µl. Los cebadores generales utilizados para la detección de los genes *cry1*, *cry2* y *cry9* se recogen en el Cuadro 1. La mezcla fue sometida a oscilaciones cíclicas en un termociclador, iniciadas por una desnaturalización de 2 min a 95°C, y seguidas por 30 ciclos de amplificación (1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C). La elongación final fue de 10 min a 72°C. Las amplificaciones se visualizaron en geles de agarosa al 1 % teñidos con Bromuro de Etidio.

Caracterización biológica de los aislados. La actividad insecticida de las mezclas de esporas y cristales obtenidas para cada uno de los aislados de *B. thuringiensis* se determinó en larvas neonatas de las siguientes especies de lepidópteros: *Trichoplusia ni*, *S. exi-*

gua, *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *H. armigera* y *L. botrana*. Las larvas de estas especies de lepidópteros fueron criadas sobre la dieta semisintética descrita por GREENE *et al.* (1976) y los adultos a base de miel diluida en el insectario de la Universidad Pública de Navarra. En el caso de *L. botrana*, la dieta empleada fue la descrita por GUENNELON *et al.* (1975). Las poblaciones de insectos se mantuvieron en cámaras a una temperatura de 25 ± 2°C, 70 ± 5% humedad relativa y un fotoperiodo de 16 h : 8 h (luz : oscuridad).

La mezcla de cristales y esporas fue suministrada a larvas neonatas según el método del disco de hoja de planta impregnado con toxina (IRIARTE *et al.*, 1998) o el de dieta artificial con toxina incorporada en una proporción 1:4 (toxina:dieta). El disco de hoja tratado o un trozo de dieta con toxina se introdujeron junto con una larva en una cajita cilíndrica de plástico (ø28mm x 18mm) que se cerró con un papel transpirable y una tapa con rejilla. Para cada uno de los aislados de *B. thuringiensis* evaluados se trataron 25 larvas que se mantuvieron a 25 ± 2°C y la mortalidad se registró a los 6 días.

Cuadro 2: Incidencia de *B. thuringiensis* en las muestras de tierra de distinta procedencia geográfica.

Origen de la muestra	Muestras analizadas	% muestras con Bt	Colonias observadas	% colonias con Bt
El Hierro	30	90	233	34
La Palma	60	85	291	65
Tenerife	188	70	594	56
La Gomera	25	84	112	72
TOTAL	306	76	1230	55

RESULTADOS

Cepas aisladas de *B. thuringiensis*. La presencia de *B. thuringiensis* se identificó en un 76% de las muestras de tierra analizadas. Según el lugar de procedencia de las muestras, el tipo de suelo, el cultivo implantado y el resto de propiedades físico-químicas del suelo, no existe diferencias notables en la riqueza en *B. thuringiensis*, y los índices variaron desde 0,7 a 0,9. El número de colonias con las características morfológicas de *B. thuringiensis* fue de 1.230 y, de éstas, en 684 se observó la presencia de cristal paraesporal. El índice medio de *B. thuringiensis* en el total de colonias observadas fue 0,55. Este índice alcanzó su mayor valor en El Hierro y el menor en Tenerife. Los valores particulares de estos índices, según la procedencia de las muestras, se reflejan en el Cuadro 2.

Diversidad de perfiles proteicos. Con la mezcla de cristales y esporas, de cada uno de los aislados, se obtuvo un perfil proteico mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Dichos perfiles presentaron una gran variabilidad tanto en el número como en el tamaño de las bandas proteicas, aunque las bandas que más predominaron tuvieron pesos moleculares de 30, 35, 45, 75, 100 y 150 kDa. Las bandas de 40, 75 y 100 kDa se encontraban en casi todos los perfiles y la de

100 kDa fue, en general, más intensa que las demás (Figura 1).

Las cepas que presentaban en sus perfiles proteicos bandas de 100 o 150 kDa fueron seleccionadas para una mejor caracterización molecular y biológica, ya que dichas bandas no se corresponden con el tamaño de ninguna de las proteínas Cry actualmente descritas. Los perfiles proteicos característicos (perfil 1-10) de cada una de estas cepas aparecen recogidos en la Figura 1.

Actividad insecticida de los aislados. En un grupo de 10 cepas, que fueron seleccionadas por su perfil proteico característico, se determinó su toxicidad para 6 especies de lepidópteros. Todas estas cepas mostraron actividad insecticida contra al menos una de las especies incluidas en este estudio, pero las cepas más tóxicas fueron las que presentaban los perfiles 2, 5, 6, 7, 9 y 10. La toxicidad de las cepas, con estos perfiles, para *T. ni*, *S. exigua*, *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *H. armigera* y *L. botrana* se muestran en el Cuadro 3.

Los aislados con el perfil proteico 6 tuvieron una elevada actividad insecticida contra todas las especies de lepidópteros incluidas en los ensayos de toxicidad cuando se utilizó como inóculo una mezcla de esporas y cristales. Estos resultados fueron similares a los obtenidos cuando se utilizaron cristales puros como inóculo (Cuadro 4), por lo que

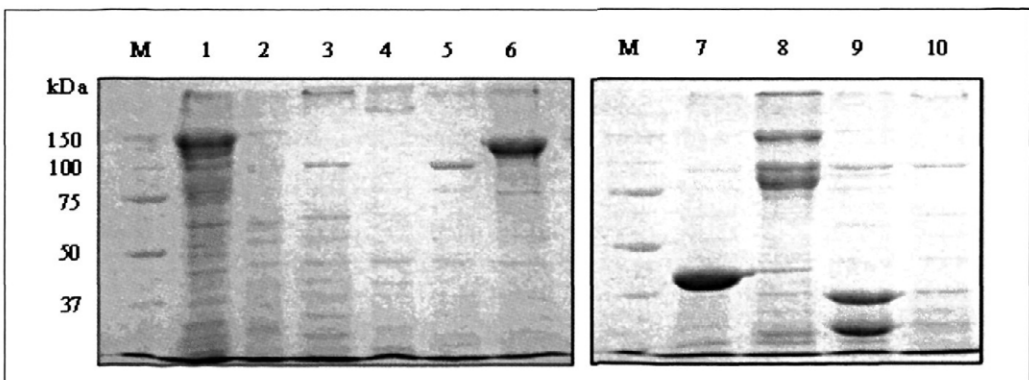


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 9%. M: marcador molecular. Carril 1-10: perfil 1-10.

Cuadro 3: Toxicidades en larvas neonatas de varias especies de lepidópteros de aislados de *B. thuringiensis* con un perfil proteico característico.

Perfil	Mortalidad (%) larvaria					
	<i>T. ni</i>	<i>S. exigua</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>H. armigera</i>	<i>L. botrana</i>
1	52	36	NT	4	NT	NT
2	92	12	NT	52	NT	4
3	16	8	NT	58	NT	12
4	20	34	12	11	12	NT
5	84	31	NT	56	NT	4
6	100	95	40	78	86,9	96
7	92	NT	20	33	8	NT
8	52	NT	16	68	NT	NT
9	78	20	24	84	NT	8
10	92	NT	8	80	NT	8

NT: No tóxica.

dicho perfil 6 tienen un amplio espectro de huéspedes y para la mayoría de las especies mostró tener una actividad insecticida similar a la de las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas como control positivo para unas concentraciones de proteína de 10 veces mayor que la correspondiente a la CL₅₀.

Detección de genes *cry* mediante PCR.

En los aislados con perfiles proteicos 2, 5, 6, 7, 9 y 10 se determinó el contenido en genes *cry1*, *cry2* y *cry9*, utilizando como cebadores generales los oligonucleótidos descritos en el Cuadro 1. La cepa Hu4-2 (MARTÍNEZ *et al.*, 2004) se utilizó como control positivo para los genes *cry1* y *cry2* y para el gen *cry9* se utilizó la cepa Z29-9. En ninguno de los aislados se obtuvieron amplificaciones lo cual sugiere que las proteínas que componen los cristales de dichos aislados sean el producto de otros genes distintos y que éstos sean probablemente genes nuevos (Figura 2).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los suelos de las islas occidentales del archipiélago canario son una importante fuente de *B. thuringiensis*. Las muestras analizadas presentaron una riqueza media en *B. thuringiensis* del 76,14%. Dicho valor es similar a lo señalado previamente por otros autores en muestreos de suelos realizados en distintas regiones de los cinco continentes (MARTIN y TRAVERS, 1989; CHILCOTT y WIGLEY, 1993). De igual modo, también se dispone de estudios en los que el porcentaje de muestras con presencia de *B. thuringiensis* oscila entre un 20 y un 30% (KARAMANLIDOU *et al.*, 1991; KAELIN *et al.*, 1994; VASQUEZ *et al.*, 1995; IRIARTE *et al.*, 1998) o hasta el 92% (BEL *et al.*, 1997). La mayor o menor riqueza de muestras con *B. thuringiensis* puede depender del número de colonias analizadas en cada muestra. Así por

Cuadro 4: Toxicidad de los cristales puros del aislado *B. thuringiensis* con perfil 6 para varias especies de lepidópteros.

Aislado Bt	Mortalidad (%) larvaria					
	<i>T. ni</i>	<i>S. exigua</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>H. armigera</i>	<i>L. botrana</i>
Perfil 6	90	85	49	52	79	100
Testigo +	92	100	83	78	100	100

Testigo +: HD1 (*H. armigera*, *L. botrana*, *T. ni*) y Xentari (*S. exigua*, *S. littoralis*, *S. frugiperda*).

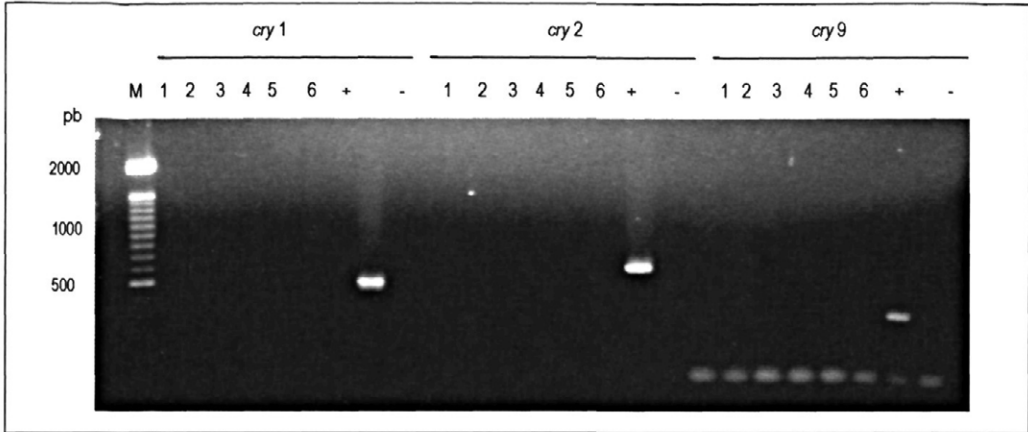


Figura. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 9%. M: marcador molecular. Carril 1-10: perfil 1-10.

ejemplo, en nuestro estudio sólo se analizaron 10 colonias por muestra mientras que en el trabajo publicado por BEL *et al.* (1997) se analizaron entre 30 y 50 colonias. Para tener en cuenta esto se utiliza el índice Bt que indica el número de colonias *B. thuringiensis* identificadas con respecto al número de colonias examinadas y está considerado como una medida del éxito en el aislamiento de *B. thuringiensis*. El índice Bt encontrado en este trabajo alcanzó un valor medio 0,55. Este índice, en muestras de suelo, puede tomar valores muy bajos de 0,006 (DE LUCA *et al.*, 1981; OHBA y AIZAWA, 1986; HASTOWO *et al.*, 1992; OHBA y ARATAKE, 1994), valores medios de 0,5 (CHILCOTT y WIGLEY, 1993) o valores altos de 0,85 (MARTIN y TRAVERS, 1989) pero puede estar influenciado por el método de selección empleado. El índice de Bt obtenido por BEL *et al.* (1997) fue de 0,28 lo cual justifica parcialmente el alto porcentaje de muestras con *B. thuringiensis* señalado por estos autores.

El número de aislados de *B. thuringiensis* obtenidos de las distintas muestras no estuvo correlacionado con el lugar de origen de las muestra lo cual está en concordancia con lo señalado por IRIARTE *et al.* (1998). Esta homogeneidad, que nosotros atribuimos a que la superficie muestreada es relativamente pequeña, contrasta con la heterogeneidad

señalada por MARTIN y TRAVERS (1989) cuyo muestreo incluyó regiones muy separadas geográficamente.

Independientemente de la mayor o menor riqueza encontrada, actualmente se admite que *B. thuringiensis* es una bacteria distribuida por todo el mundo y se haya presente en prácticamente todos los hábitats muestreados. Nuestros resultados claramente revelan la presencia de *B. thuringiensis* en todo el territorio muestreado y, por tanto, permiten confirmar que el enclave geográfico de las islas occidentales del archipiélago canario no son una excepción en este sentido.

Las familias de los genes *cry1*, *cry2* y *cry9* de *B. thuringiensis* producen proteínas de 130-140 kDa, 65-70 kDa y 130 kDa, respectivamente, y son las únicas descritas hasta la fecha con actividad insecticida contra lepidópteros (SCHNEPF *et al.*, 1998; CRICKMORE, 2000). La ausencia de amplificaciones en los aislados de *B. thuringiensis* seleccionados en este estudio, cuando se utilizan cebadores generales diseñados para estos genes, sugiere la ausencia de tales genes en dichos aislados. Por otra parte, el tamaño de las proteínas que componen el cristal de los aislados seleccionados no se corresponde con el producto de ninguno de los genes *cry* hasta ahora clonados y secuenciados (CRICKMORE, 2000). Sin embargo, los

aislados seleccionados resultaron ser tóxicos, en mayor o menor medida, frente a, al menos alguna de las especies de lepidópteros incluidas en el bioensayo. Esto sugiere que las proteínas del cristal de los aislados seleccionados son nuevas proteínas con actividad insecticida para lepidópteros. Los aislados de *B. thuringiensis* cuyos cristales paraesporales estaban compuestos por proteínas de pesos moleculares 75, 100 y 150 kDa fueron los que mostraron tener una mayor actividad insecticida para seis especies de lepidópteros pertenecientes a dos familias distintas (Noctuidae y Tortricidae). Esto puede ser debido a que alguna de estas tres proteínas tenga un elevado potencial tóxico para las larvas de lepidópteros o bien a que entre ellas exista una acción sinérgica tal y como ha sido demostrado para otras proteínas Cry de *B. thuringiensis* (DUBOIS y DEAN, 1995; LEE *et al.*, 1996).

Los perfiles proteicos de los aislados *B. thuringiensis* identificados en este trabajo permiten deducir que, en su conjunto, las proteínas más frecuentemente encontradas en los cristales de los mismos tienen pesos moleculares de 30, 35, 45, 75, 100 y 150 kDa. En trabajos anteriores se han descrito proteínas con tamaños similares pero no se les ha atribuido actividad insecticida alguna

(IRIARTE *et al.*, 2000). Sin embargo, en otros trabajos (IRIARTE *et al.*, 1998) se ha descrito la presencia de un aislado que contenía una banda de 98 kDa y que mostró buena actividad contra *H. armigera*.

Los resultados de este trabajo sugieren que las proteínas producidas por los aislados Bt identificados son el producto de nuevos genes *cry* aún no clonados y secuenciados. Estas supuestas nuevas proteínas servirían para ampliar el conjunto de proteínas Cry conocidas y, en consecuencia, las posibilidades de *B. thuringiensis* en el desarrollo de nuevos productos bioinsecticidas, en la construcción de plantas transgénicas y como alternativa a las proteínas actualmente utilizadas en los casos de desarrollo de resistencias en las poblaciones de insectos (FERRÉ *et al.*, 1991; TABASHNIK *et al.*, 1994). El interés de estas nuevas proteínas será mayor si no comparten sitios de unión, en la membrana del mesenterón del insecto, con las proteínas actualmente en uso (FERRÉ y VAN RIE, 2002).

Los resultados de este trabajo sugieren que esta nueva colección de aislados de las Islas Canarias, puede ser una fuente importante de nuevas proteínas Cry aunque es necesaria una mayor caracterización molecular y biológica antes de determinar de forma concluyente su verdadero valor insecticida.

ABSTRACT

RUIZ DE ESCUDERO I., I. IBÁÑEZ, M. A. PADILLA, A. CARNERO, P. CABALLERO. 2004: Isolation and characterization of new *Bacillus thuringiensis* strains in soils of the Canary Islands. *Bol. Sa. Veg. Plagas*, 30: 703-712.

Bacillus thuringiensis is a world wide distributed bacterium that can be easily isolated from soil samples and many other substrates. The ability to produce proteins with specific toxicity for insects is its more important characteristic. So far, more than 250 holotypes of these proteins are known. Nowadays, *B. thuringiensis* is, by far, the most used entomopathogenic microorganism in pest control, giving rise to the development of some insect resistance biotypes under field conditions. The identification and characterization of new *B. thuringiensis* Cry proteins is therefore essential to both: contribute to extend the host range of this bacterium and have alternative strains against resistant biotypes. The objective of this work was to determine the diversity of *B. thuringiensis* isolated from soil samples from the Canary Islands and to identify strains which produce novel Cry proteins. With this aim, 306 soil samples collected from different locations in the islands of the Canary archipelago were analyzed. A total of 684 isolates were obtained. Parasporal crystal proteins of the different isolates were analyzed in SDS-PAGE and characteristic protein profiles were defined. The profiles of some of these isolates showed a protein band of around 100 kDa. Analysis by PCR with general *cry* primers demonstrated that these strains do not contain any of the *cry1*, *cry2* or *cry9* genes, with

well-known insecticide activity against Lepidoptera. However, some of these strains show a high insecticide activity against different species of lepidoptera such as *Helicoverpa armigera*, *Lobesia botrana*, *Spodoptera exigua*, *S. littoralis*, *S. frugiperda* and *Trichoplusia ni*, suggesting that these strains produce new Cry proteins.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, isolates, Canary Islands, Cry proteins, toxicity, Lepidoptera, bioassay.

REFERENCIAS

- BEL, Y.; GRANERO, F.; ALBEROLA, T. M.; MARÍNEZ-SEBASTIAN, M. y FERRÉ, J., 1997: Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *System Appl Microbiol*, **20**: 652-658.
- BEN-DOV, E.; WANG, Q.; ZARITSKY, A.; MANASHEROB, R.; BARAK, Z.; SCHNEIDER, B.; KHAMRAEV, A.; BAIZHANOV, M.; GLUPOV, V. y MARGALITH, Y., 1999: Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 3714-3716.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N. y MARGALITH, Y., 1997: Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, **63**: 4883-4890.
- BRADFORD, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NÚÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERON, M. y QUINTERO, R., 1998: Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 4965-4972.
- CRICKMORE, N., 2000: The diversity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. En: *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* (ed. J. F. Charles, A. Delécluse y C. Nielsens-LeRoux), pp. 41-64. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPP, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. y DEAN, D. H., 1998: Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 807-813.
- CHILCOTT, C. N. y WIGLEY, P. J., 1993: Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand.
- DE LUCA, A. J.; SIMONSON, J. G. y LARSON, A. D., 1981: *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol.*, **27**: 865-870.
- DE LUCA, A. J.; PALMGRAN, M. S. y CIEGLER, A., 1982: *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. *Can. J. Microbiol.*, **28**: 452-456.
- DUBOIS, N. R. y DEAN, D. H., 1995: Synergism between CryIA insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. *Environ Entomol*, **24**: 1741-1747.
- ESCRICHE, B. y FERRÉ, J., 2001: Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En: *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas* (ed. P. Caballero y J. Ferré), pp. 87-108. M. V. Phytoma-España, S. L. y Universidad Pública de Navarra, Valencia.
- ESCRICHE, B.; FERRANDIS, M. D.; HERNÁNDEZ, C. S.; HERRERO, S.; MARTÍNEZ, C. y PORCAR, M., 2001: Técnicas básicas en el trabajo con *Bacillus thuringiensis*. En: *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas* (ed. P. Caballero y J. Ferré), pp. 297-318. M. V. Phytoma-España, S. L. y Universidad Pública de Navarra, Valencia.
- FERRÉ, J. y VAN RIE, J., 2002: Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, **47**: 501-533.
- FERRÉ, J.; REAL, M. D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S. y PEFFEROEN, M., 1991: Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 5119-5123.
- GOLDBERG, L. J. y MARGALIT, J., 1997: A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Unanotaenic unguiculara* and *Culex pipiens*. *Mosq. News*, **37**: 355-358.
- GREENE, G. L.; LEPLA, N. C. y DICKERSON, W. A., 1976: Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol*, **69**: 487-488.
- GUENNELON, G.; D'ARCIER, F. y TRINCAL, J., 1975: Description d'une production massive de l'eudemis de la vigne sur milieu artificiel (*Lobesia botrana* Schiff, Lepidoptera: Tortricidae). *Ann. Zool. Eco. Anim.*, **7**: 295-309.
- HASTOWO, S.; LAY, B. W. y OHBA, M., 1992: Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *J. App. Bact.*, **73**.
- HEIMPEL, A. M., 1967: A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annu Rev Entomol*, **12**: 287-322.
- IRIARTE, J.; PORCAR, M.; LECADET, M. y CABALLERO, P., 2000: Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. *Curr Microbiol*, **40**: 402-408.
- IRIARTE, J.; BEL, Y.; FERRANDIS, M. D.; ANDREW, R.; MURILLO, J.; FERRE, J. y CABALLERO, P., 1998: Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Syst Appl Microbiol*, **21**: 97-106.
- KAELIN, P.; MOREL, P. y GADANI, F., 1994: Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasi-dema serricone*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 19-25.

- KARAMANLIDOU, G.; LAMBROPOULOS, A. F.; KOLIAIS, S. I.; MANOUSIS, T.; ELLAR, D. y KASTRITSIS, C., 1991: Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Appl Environ Microbiol*, **57**: 2277-2282.
- LAEMMLI, U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E. y DEAN, D. H., 1996: Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Appl Environ Microbiol*, **62**: 583-586.
- MACINTOSH, S. C.; STONE, T. B.; SIMS, S. R.; HUNST, P. L.; GREENPLATE, J. T.; MARRONE, P. G.; PERLAK, F. J.; FISCHHOFF, D. A. y FUCHS, R. L., 1990: Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J Invertebr Pathol*, **56**: 258-266.
- MARTIN, P. A. W. y TRAVERS, R. S., 1989: Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 2437-2442.
- MARTÍNEZ, C.; PORCAR, M.; LÓPEZ, A.; RUIZ DE ESCUDERO, I.; PÉREZ-LLARENA, F. J. y CABALLERO, P., 2004: Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol Exp Appl.*, **111**: 71-77
- MEADOWS, M. P.; ELLIS, D. J.; BUTT, J.; JARRET, P. y BURGESS, H. D., 1992: Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1344-1350.
- NAVON, A., 2000: *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. En: *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* (ed. J. F. Charles, A. Delécluse y C. Nielssen-LeRoux), pp. 355-369. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- OHBA, M. y AIZAWA, K., 1986: Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J Invertebr Pathol*, **47**: 277-282.
- OHBA, M. y ARATAKE, Y., 1994: Comparative study of the frequency and flagellar serotype flora of *Bacillus thuringiensis* in soils and silk-worm breeding environments. *J. App. Bact.*, **76**: 203-209.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R. y DEAN, D. H., 1998: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 775-806.
- SMITH, R. A. y COUCHE, G. A., 1991: The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**.
- STEWART, G. S.; JOHNSTONE, K.; HAGELBERG, E. y ELLAR, D. J., 1981: Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *Biochem J*, **198**: 101-106.
- TABASHNIK, B. E.; FINSON, N.; GROETERS, F. R.; MOAR, W. J.; JOHNSON, M. W.; LUO, K. y ADANG, M. J., 1994: Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 4120-4124.
- VASQUEZ, M.; PARRA, C.; HUBBERT, E.; ESPINOZA, P.; THEO DULOZ, C. y MEZA-BASSO, L., 1995: Specificity and insecticidal activity of Chilean strains of *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*, **66**: 143-148.
- WHITELEY, H. R. y SCHNEPF, H. E., 1986: The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Microbiol*, **40**: 549-576.

(Recepción: 18 febrero 2004)

(Aceptación: 18 junio 2004)