

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE AISLAMIENTO DE CEPAS PRESUNTIVAS DE *B. thuringiensis* Y LA DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES GENÉTICOS MEDIANTE SSCP-PCR, EN DISTINTOS NICHOS DE LA FILO-ESFERA DEL ÁRBOL DEL AGUACATE, *Persea americana*, var. 'Hass'.

Dinora Roche Recinos, Maricruz Álvarez Mury, Sheryl Schneider de Cabrera, Pamela Pennington de Sánchez, Luis Andrés Arévalo Rodríguez & Carlos E. Rolz Asturias

Resumen

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positivo, espora formadora y móvil. Ha sido aislada de suelo, graneros, productos almacenados, cadáveres de insectos y follaje. Se caracteriza por la producción durante la esporulación de inclusiones paraesporales cristalinas que contienen proteínas insecticidas. El espectro de actividad de estas proteínas incluye al menos tres órdenes, Lepidóptera, Coleóptera y Díptera así como nemátodos. El objetivo principal del estudio consistió en comprobar la existencia de cepas nativas guatemaltecas de *B. thuringiensis* en la filoesfera del árbol de aguacate *Persea americana* variedad Hass. El estudio se enfocó en el aislamiento de *B. thuringiensis* de: hojarasca, follaje y suelo de árboles de aguacate Hass provenientes de dos plantaciones comerciales, ubicadas en dos regiones de Guatemala. La única prueba para la confirmación de los presuntos aislados de *B. thuringiensis* utilizada, fue la tinción de cristales con azul de Coomassie de acuerdo a la definición de *B. thuringiensis* (Bt) dada en el estudio. Se encontraron 171 presuntos aislados positivos de 296 aislados. Las cifras del índice Bt fueron relativamente altas sugiriendo que en, o cerca de, las plantaciones se habían empleado recientemente productos comerciales conteniendo Bt. La segunda fase del estudio consistió en la extracción del ADN de los aislados y el análisis por medio de SSCP para la detección de sus mutaciones puntuales, además del análisis estadístico de las variantes genéticas por medio del índice de Simpson. Luego del análisis con SSCP y uso el índice de Simpson, se encontró que en el suelo de la región de Alta Verapaz, existe mayor cantidad de cepas mutantes, y se puede inferir que dentro de estas se podrían encontrar cepas nativas.

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram positive, spore forming and mobile bacteria. It has been isolated from soil, barns, stored products, insect cadavers and leaves. It is characterized by the formation of crystal paraspore inclusions during sporulation that contain insecticide proteins. The activity spectrums of these proteins include at least three orders, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera and nematodes. The principal objective of this study was to prove the existence of native Guatemalan strains of Bt in the phylosphere of the Hass variety avocado trees, *Persea americana*. The study was focused in the isolation of Bt from soil, foliage and dead leaves of Hass avocado trees from two commercial plantations located in two Guatemala states. The only proof used for the confirmation of the presumptive Bt isolates was the Coomassie blue stain for crystals, according to the definition for Bt given in the study. One hundred seventy one presumptive positive isolates were found out of 296 isolates. Bt index figures were on the high side suggesting that in or near the plantations, commercial products containing Bt had been sprayed recently. The second phase of the study consisted of extraction of the DNA from the isolates and analysis by the SSCP technique for the detection of punctual mutations, besides the statistical analysis of the genetic variants by the Simpson index. After SSCP analysis and use of the Simpson index, it was determined that most of the mutant strains came from the soil sample from Alta Verapaz, and it can be inferred that within these stocks the native Bt strains could be present.

Introducción

En el género *Bacillus*, existe un grupo homogéneo de especies de bacterias, compuesto por *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis*, las cuales están íntimamente relacionadas, aunque existe todavía un debate para establecer con veracidad las características taxonómicas y filogenéticas que las diferencien (Jensen et al. 2003). Al *B. thuringiensis* (Bt) se le considera un patógeno de insectos debido a la presencia de grandes cristales proteicos denominados δ -endotoxinas, los cuales se emplean para diferenciar con certeza a éste de los demás miembros del grupo anteriormente mencionado. Los preparados comerciales del Bt se han empleado como insecticidas biológicos desde los años de 1940 con el objeto de controlar una

gran variedad de insectos plaga en una amplia gama de cultivos comerciales.

El Bt es una bacteria Gram positivo, espora formadora y móvil gracias a sus flagelos peritricos, (Ghelardi et al., 2002). Las células vegetativas miden aproximadamente $1\mu\text{m}$ de ancho por 5 de largo (Chattopadhyay, 2004). Los aislados de Bt de agar nutritivo e incubadas a $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ forman colonias con morfología circular y son blancas, planas, onduladas o enteras (Chatterjee et al., 2007).

El ciclo de vida del Bt está dividido en dos fases, el crecimiento vegetativo y la esporulación. Durante la primera fase, cuando la bacteria está en un ambiente rico en nutrientes, el crecimiento

es exponencial. Cuando los nutrientes escasean, la bacteria esporula, formando esporas que permanecen viables en el ambiente por largo tiempo hasta que retornan las condiciones favorables para el crecimiento vegetativo.

Durante la esporulación el Bt produce una variedad de δ -endotoxinas (proteínas cry, cristal δ -endotoxinas o cristales de endotoxinas- δ) que son primariamente responsables de su actividad insecticida altamente específica (de Maagd et al., 2003). Las inclusiones paraesporales contienen muchas proteínas, que algunas veces poseen distintas actividades y pueden actuar de manera sinérgica. Adicional a las toxinas cry y cyt, el Bt posee un cierto número de factores de virulencia incluyendo α -exotoxinas, beta-exotoxinas,

quitinasas, proteína insecticida vegetativa (Vip), flagelina, enterotoxinas, hemolisinas y fosfolipasas (Chattoopadhyay, 2004).

Aunque el Bt ha sido considerado un habitante común del suelo (Martin y Travers, 1989) la ecología de la bacteria sigue siendo en parte un enigma (Jensen, 2003). Se ha aislado con frecuencia en los graneros, en cadáveres de insectos y en el filo-esfera de las plantas (Bernhard et al., 1997; Smith & Couche, 1991). Es lógico que en el follaje de las plantas se encuentren cepas de Bt ya que a ellas llegan los insectos herbívoros. Los cadáveres de los insectos caen al suelo y en ellos se reproduce el Bt. El ciclo llega a completarse cuando el Bt por aire y lluvia se deposita de nuevo en el follaje (Maduell et al., 2007). Algunos autores consideran la posible existencia de un beneficio mutuo entre planta y

bacteria, pudiendo considerarse a las bacterias como verdaderos guardaespaldas de las plantas (Elliot et al., 2000).

Guatemala es un país netamente agrícola, y hoy en día el aguacate ha ganado terreno comercial. Al momento de establecer cualquier monocultivo, la incidencia de organismos asociados (potencialmente plagas) aumenta, generando la necesidad de utilizar métodos para reducir el daño causado sobre la planta. Aún cuando los insecticidas obtenidos por síntesis química han sido la herramienta más utilizada en las últimas décadas, los bioinsecticidas han empezado a ganar terreno, convirtiéndose en una excelente alternativa del método tradicional de control. En el mercado es posible encontrarse con opciones como: el Bt, hongos, nemátodos parásitos de insectos y las bacterias entomopatógenas. El Bt

constituye el 90% de los bioinsecticidas del mercado (Chattoopadhyay, 2004).

Con el objetivo de obtener una alternativa natural viable para el manejo de las plagas del aguacate, se aislaron mediante cultivo en medio selectivo, cepas nativas de Guatemala de Bt del filo-esfera del árbol de aguacate, es decir, follaje, hojarasca y suelo. Durante la ejecución del presente estudio salió publicado un artículo llevado a cabo en México con objetivos similares (Rosas-García, 2008), en el cual se aisló el Bt de suelos de plantaciones comerciales de ese país, y se caracterizó molecularmente la región del gen 16S del ADN ribosomal (ADNr) utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar los polimorfismos conformacionales de hebra única (SSCP-PCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas control. Las cepas control positivo utilizadas para este estudio fueron: DSMZ 6106 *Bacillus thuringiensis* serovar sotto, serovar (4a4b) y DSM 6112 *Bacillus thuringiensis* serovar morrisoni serovar (8a8b) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ), además de Dipel comercial: *Bacillus thuringiensis* Berliner var *kurstaki* (BST-88, Agrícola El Sol).

Muestreo. Para este estudio se realizaron dos muestreos, cada uno en una región diferente. El primer muestreo se realizó en una finca de la aldea Santa Ana municipio de Antigua Guatemala (14°32'57.07" N – 90°43'11.92" O) departamento de Sacatepéquez, y el segundo muestreo se llevó a cabo en la finca "Don Bosco" en Tactic municipio del departamento de Alta Verapaz (15°24'7.68" N – 90°24'25.98" O). Sacatepéquez posee 2,351 fincas de aguacate con una producción de 52,411 quintales, y Alta Verapaz con 7,501 fincas y produce 40,694 quintales de aguacate (MAGActual, 2005).

El departamento de Sacatepéquez, se encuentra en la región central del país, la cual es una zona eminentemente agrícola donde el cultivo de productos agrícolas tradicionales tales como las hortalizas determina un renglón importante de la economía y por ello el uso de insecticidas tanto químicos como naturales (bioinsecticidas) constituyen una práctica común.

Las muestras se tomaron de diez árboles seleccionados al azar, de los cuales se obtuvieron muestras de follaje, hojarasca y suelo. Las muestras de follaje se recolectaron de acuerdo a Smith (1991); la hojarasca se recogió por debajo del área de copa de los árboles y las muestras de suelo se extrajeron a una profundidad de 0-20 cm cavando un agujero en forma de "V". Todas las muestras fueron colocadas en bolsas con cremallera plástica y almacenadas en hieleras para su transporte al laboratorio.

Es necesario indicar que no se constató en alguna de las dos plantaciones muestreadas que hubiesen usado en el pasado reciente algún producto comercial conteniendo Bt.

Cultivo y aislamiento. El método de aislamiento seleccionado se basó en el tipo de muestra debido a que las condiciones de cada una favorecen distintas fases de crecimiento de la bacteria. Para el aislamiento a partir de muestras de follaje se pesaron 0.5g de hojas de la muestra y se colocaron en 10mL de caldo nutritivo, el cual se incubó con agitación a 250 rpm a 28-30°C por 4 horas y posteriormente se dejó incubar toda la noche a 34°C sin agitación.

A las 24 horas, el cultivo fue colocado en baño de María a 80°C por 15min, y luego en hielo por 15min más. Se tomó una alícuota de 10µL, la cual se inoculó por vertido en placa en agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID (Chromogenic Agar for *B. cereus* de OXOID) y se incubó a 28-30°C por 24 horas. Al terminar la incubación se seleccionaron al azar cinco (5) colonias, y se sembraron en agar nutritivo, incubado a 28-30°C por 24 horas. Para el aislamiento a partir de muestras de hojarasca se siguió el mismo procedimiento exceptuando el proceso de agitación con caldo nutritivo, por lo que reposaron toda la noche a 34°C. Para el aislamiento a partir de muestras de suelo, se siguió el procedimiento descrito por Apaydin, et al., (2005), en el cual el suelo se agita con 9.5 mL de caldo nutritivo adicionado con 0.5mL de solución de acetato de sodio 0.25M, a 34 °C durante toda la noche. Para el segundo muestreo se utilizó el mismo agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID con adición de emulsión de yema de huevo. Se sumergió un huevo en etanol absoluto al 95% por 5min, luego se lavó con abundante agua estéril. Se partió el huevo asépticamente cuidando de no romper la yema y separándola de la clara. Se mezcló la yema con solución salina estéril (solución salina isotónica 0.9% de NaCl libre de sustancias pirogénicas) en una proporción de 2.33 a uno v/v. De la mezcla se tomaron 5mL y se agregaron a 100mL del agar, a una temperatura de 50 °C para evitar que la emulsión proteica de la yema se desnaturalizara. Posterior a la incubación las colonias de interés al estudio presentaron un halo blanquecino alrededor debido a la acción de la lecitinasas.

Confirmación de aislados microbiológicos. Luego de 48 horas de incubación a 28-30°C se tomó una muestra de las colonias y se prepararon dos frotis, uno con tinción de Gram modificada de acuerdo a BIOLOG (2003), para confirmar su morfología microscópica, y evitar causar distorsiones en la célula. Para el segundo, se utilizó la tinción de cristales con azul de Coomassie de acuerdo a Niedmann & Meza-Basso (2006), para determinar la presencia de los cristales típicos de Bt. Ambos se observaron al microscopio (1000x). Esta fue la única prueba de confirmación de los presuntos aislados de Bt.

Preparación del ADN. El ADN para el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtuvo a partir de las colonias aisladas. Se extrajo y purificó con el kit UltraClean™, Soil DNA Isolation de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se escogió la región del ADN ribosomal que contiene el gen 16S porque es una secuencia que cambia lentamente en el tiempo y permite determinar relaciones filogenéticas entre organismos.

Prueba de PCR para las cepas presuntivas de Bt. Los cebadores 50F y 222R fueron diseñados para este estudio y sintetizados por IDT, (Integrated DNA Technologies) ver Cuadro 1.

Las especificidades de todos los cebadores fueron examinadas usando las cepas control: 6106 *B. thuringiensis* serovar sotto, serovar (4a4b) (DSMZ), 6112 *B. thuringiensis* serovar morrisoni serovar (8a8b) (DSMZ) y Dipel®: *B. thuringiensis* var *kurstaki* (BST-88, Agrícola El Sol).

Cada 10uL de la mezcla de 16S ADNr SSCP-PCR contenía: buffer de PCR 1Xr, desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (0.2mM ea), mezcla de cebadores (50F y 222R, 1.2pmol/uL ea), MgCl₂ (2.5 mM), Taq polimerasa (0.01uL, INVITROGEN) y el templado de ADN (1uL). El PCR fue realizado con el termociclador (NYX TECHNIK, ATC 201) usando un ciclo a 94°C por 3min, seguido de 30 ciclos de: 94°C por 30s, 49 por 30s y 72 por 1min 30s y una

extensión final a 72°C por 10min. Los amplicones del PCR fueron desnaturalizados usando un ciclo a 95°C por 5min, y analizados por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en buffer TBE 0.5X. Para su visualización el gel se tiñó usando tinción de plata.

Diseño experimental. Para el análisis de los datos moleculares se utilizó la medición de la diversidad genética con base en marcadores genéticos (Grundmann *et al.*, 2001) utilizando los perfiles producidos a partir del SSCP-PCR que se reportaron por medio del índice de Simpson (D) el cual mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie (o alguna otra categoría diferente de especie). Un valor del índice igual a 0 representa una diversidad infinita y 1, que no hay diversidad. (Grundmann *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Cebadores utilizados en este estudio

Cebador	Gen blanco	Secuencia (5'-3') pares de bases (pb)	Tamaño del amplicón de PCR
50F 222R	16S ADNr	ACATGCAAGTCGAGCGAAT TCCATCCATAAGTGACAG	220-154

RESULTADOS

De las dos fincas se procesaron 59 muestras, correspondientes a los tres diferentes tipos: suelo, hojarasca y follaje, es decir los elementos correspondientes a la filo-esfera del árbol de aguacate. La tinción de Gram, para verificar la presencia de bacilos Gram positivo permitió obtener 150 aislados de la colecta realizada en el departamento de Sacatepéquez. La morfología de la colonia correspondió a la descripción descrita en la literatura, es decir, colonias circulares, blancas, planas, onduladas o enteras. Un ejemplo de la morfología de las colonias y su frote correspondiente se muestran en el Cuadro 2.

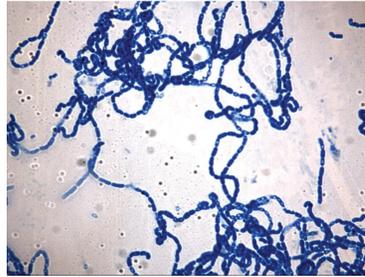
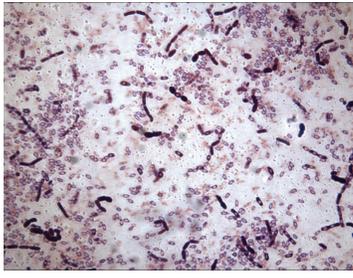
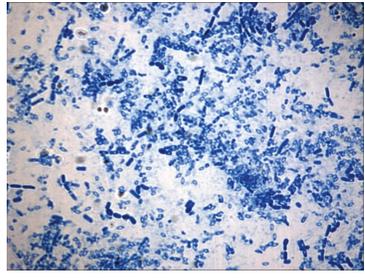
Luego por medio de la coloración de azul de Coomassie se cuantificaron 98 aislados positivos de los 150 aislados iniciales, o sea un 65.33%. Los resultados obtenidos para la coloración con azul de Coomassie se muestran en el Cuadro 3. De la segunda colecta, realizada en el departamento de Alta Verapaz, se obtuvo un total de 146 aislados. La colonia y el frote se observaron como se muestra en el Cuadro 4. Luego, como se muestra en el Cuadro 5, se cuantificaron 73 positivos de los 146 aislados, o sea un 50.00%.

En total, la proporción de presuntos aislados cristal positivo (CP) de acuerdo la definición de Bt fue de 171 de 296 aislados, o sea un 57.77%. En la literatura consultada es común emplear el denominado índice Bt, igual al cociente del número de aislados CP sobre la cantidad de aislados de bacterias que esporularon, como cifra de referencia para este tipo de resultados. Empleando esta definición, los índices Bt fueron de 0.65 y de 0.50 para el muestreo de Sacatepéquez y Alta Verapaz, respectivamente. Para el total de la prueba el índice Bt fue de 0.58.

Se determinó el perfil genético de mutaciones para la región 16S del ADN ribosomal de los 171 presuntos aislados positivos, por medio de la técnica de SSCP. Los resultados se muestran en los Cuadros 6 y 7, para el primero y segundo muestreo respectivamente. El análisis de diversidad genética mostró que en muestras de suelo, hojarasca y follaje en el primer muestreo se aislaron cuatro, seis y cinco diferentes variantes genéticas respectivamente. Para el segundo muestreo se aislaron nueve variantes genéticas de la muestra de suelo, cinco de la muestra de hojarasca y tres de la de follaje.

Los índices de Simpson calculados para los dos muestreos y los tres diferentes tipos de muestra se han anotado en el Cuadro 8. Las muestras de suelo, hojarasca y follaje en el primer muestreo tuvieron un índice de Simpson de 0.702 (IC95%, 0.438-0.966), de 0.223 (IC95%, 0.153-0.293) y de 0.392 (IC95%, 0.280-0.504), respectivamente. Para el segundo muestreo los valores fueron de 0.185 (IC95%, 0.092-0.279), de 0.424 (IC95%, 0.107-0.742) y de 0.511 (IC95%, 0.309-0.703) respectivamente.

Cuadro 2. Fotos ilustrativas de las colonias y el frote Gram y azul de Coomassie de una muestra de suelo del primer muestreo.

Muestra	Colonia (Número)	Morfología de la Colonia	Morfología con tinción Gram	Morfología con tinción con Azul de Coomassie
1S1	1	 <p>Color: Blanca. Apariencia: Mucoide, lisa. Borde: Lobulado. Elevación: Plana.</p>	 <p style="text-align: center;">+</p>	 <p style="text-align: center;">-</p>
	2	 <p>Color: Blanca. Apariencia: Mucoide, lisa. Borde: Ondulado. Elevación: Umbilicada.</p>	 <p style="text-align: center;">+</p>	 <p style="text-align: center;">+</p>

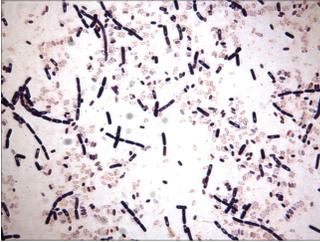
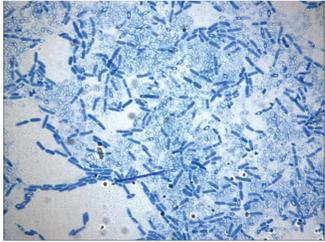
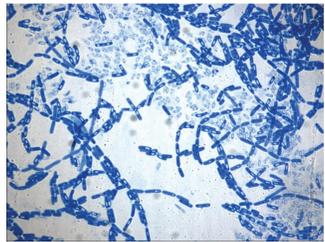
Las muestras se codificaron de la siguiente manera: Tipo de muestra: S (suelo), F (folleaje) y H (hojarasca). ID = No. de Muestra + Tipo de Muestra + No. de muestreo + No. de Colonia. Entonces por ejemplo, si la muestra se llamara 1S12, sería la muestra 1 de suelo del primer muestreo y de la colonia 2.

Cuadro 3. Resultados obtenidos para muestras de Sacatepéquez de acuerdo con la observación al microscopio con tinción azul de Coomassie.

Muestra	Colonia	Colonia					Total
		1	2	3	4	5	
Hojarasca	1	+	+	+	+	-	
	2	+	+	+	+	+	
	3	+	-	-	-	+	
	4	+	+	+	-	+	
	5	+	+	+	+	+	
	6	+	-	-	+	+	
	7	-	-	-	-	-	
	8	+	-	+	-	+	
	9	-	+	+	+	-	
	10	-	-	+	-	-	
						Total	30
Folleaje	1	+	+	-	+	+	
	2	+	+	+	+	+	
	3	+	+	+	+	+	
	4	+	+	+	+	+	
	5	+	+	+	+	+	
	6	+	+	+	+	+	
	7	+	+	+	+	+	
	8	+	+	+	+	+	
	9	+	+	+	+	+	
	10	+	+	+	+	+	
						Total	49
Suelo	1	-	+	-	+	/	
	2	-	-	/	/	+	
	3	+	+	-	+	-	
	4	-	+	+	/	+	
	5	-	-	-	-	-	
	6	/	+	+	+	+	
	7	-	+	-	-	-	
	8	+	+	+	-	-	
	9	-	+	/	-	-	
	10	-	+	-	-	-	
						Total	19

(+) Cristal positivo; (-) Cristal negativo y (/) posible positivo (no fue analizada molecularmente).

Cuadro 4. Fotos ilustrativas de las colonias y el frote Gram y azul de Coomassie de una muestra de suelo del segundo muestreo.

Muestra	Colonia (Número)	Morfología de la Colonia	Morfología con tinción Gram	Morfología con Tinción con Azul de Coomassie
1S2	1	 Color: Blanca. Apariencia: Mucoide, lisa. Borde: Lobulado. Elevación: Plana.	 +	 -
	2	 Color: Blanca. Apariencia: Mucoide, lisa. Borde: Lobulado. Elevación: Plana.	 +	 +

Las muestras se codificaron de la siguiente manera:

Tipo de muestra: S (suelo), F (follaje) y H (hojarasca).

ID = No. de Muestra + Tipo de Muestra + No. de muestreo + No. de Colonia

Entonces por ejemplo, si la muestra se llamara 1S22, sería la muestra 1 de suelo del segundo muestreo y de la colonia 2.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las colonias cristal positivo (CP) observadas al microscopio cumplieron con las características del Bt, ya que todas fueron Gram positivo y cristal positivo. El índice Bt en los dos muestreos estuvo en o por arriba de 0.50, indicando con esto que el Bt prevalecía sobre las demás bacterias aisladas capaces de esporular. En el Cuadro 9 se ilustran los índices Bt para los diferentes tipos de muestra en ambas plantaciones.

Se obtuvo significativamente un mayor aislamiento de cepas CP en hojarasca y follaje en Sacatepéquez, comparado a los mismos nichos en Alta Verapaz. El 60 % (IC95%, 46-72%) de los aislados de la hojarasca de Sacatepéquez eran CP mientras que sólo el 26 % (IC95%, 16-40%) de los aislados de la hojarasca en Alta Verapaz eran CP. Fue inesperado obtener un índice Bt de 0.98 en follaje de Sacatepéquez. En Alta Verapaz

el índice Bt era muy similar entre muestras del follaje y muestras del suelo. Finalmente el índice Bt en muestras de suelos de Alta Verapaz fue superior al índice obtenido en muestras de suelo de Sacatepéquez. Por lo tanto puede decirse que: a) en ambas plantaciones el índice Bt para todas las muestras en conjunto estuvo en 0.50 o más, indicando prevalencia del Bt sobre otras bacterias esporuladas y b) los valores del índice Bt para hojarasca, follaje y suelo fueron diferentes en las dos plantaciones muestreadas.

En muestras de suelos de plantaciones de aguacate de los estados mexicanos de Michoacán y Nayarit, Rosas-García et al. (2008) reportaron índices de Bt de 0.092 y 0.018. Estas cifras son extremadamente bajas comparadas con las de este estudio, aunque es importante recordar que en estas comparaciones no solo pueden existir

diferencias ecológicas y ambientales, sino que también diferencias debido a la metodología de muestreo, procesamiento de las muestras y de la técnica del aislamiento. En un estudio de muestras de suelos a nivel mundial, incluyendo tres muestras de Guatemala, Martín y Travers (1989) encontraron una amplia gama de índices Bt, desde 0.02 hasta 0.85, con un valor medio de 0.28. Curiosamente los suelos de Asia fueron los que mostraron el mayor índice Bt. Bravo et al. (1998) al analizar 503 muestras de suelos de diferentes regiones ecológicas de México encontraron un índice Bt igual a 0.28. Días et al. (1999) en muestras de suelos argentinos que no habían sido tratados con productos comerciales de Bt, reportaron un índice Bt de 0.02, siendo, por otro lado el *B. cereus* el predominante. En el mismo país, en muestras de suelos, polvos de graneros y cadáveres de insectos, Beron y Salerno

(2006) reportaron un índice de 0.03. Hastowo et al. (1992) en suelos de Indonesia informaron un índice Bt de 0.06. Hossain et al (1997) en suelos de Bangladesh reportaron un valor del índice igual a 0.75, explicando su alto valor por la posible alta presencia de insectos plaga en dicho país. Apaydin et al (2005) en muestras de suelo, granos, polvo de graneros, cadáveres de insectos y varios residuos, de seis regiones diferentes de Turquía, reportaron un valor medio del índice Bt de 0.33, y un intervalo entre regiones desde 0.16 hasta 0.59. Quesada-Moraga et al. (2004) en muestras de suelos de cuatro localidades en Islas Canarias, España, reportaron valores desde 0.065 a 0.110.

En lo que se refiere a la recuperación de cepas de Bt del follaje de diferentes plantas, Ohba (1996) en Japón encontró un índice Bt de 0.032 en

plantaciones de morera, cuyas hojas se emplean en la dieta del gusano productor de seda, aunque debe decirse que la variación entre diferentes hojas fue alta. Damgaard et al (1999) en hojas de repollo proveniente de plantaciones comerciales encontró un índice Bt medio de 0.110, aunque el mismo sufrió variaciones considerables de acuerdo al estado de desarrollo de la planta pero sin una tendencia definida. Mizuki et al (1999) en hojas de diferentes plantas en varias provincias de la Prefectura de Fukuoka en Japón, obtuvieron valores entre 0.016 hasta 0.040. Kaur & Singh (2000) en hojas de plantaciones de cuatro leguminosas encontraron cifras del índice Bt desde 0.070 hasta 0.200, siendo significativas las diferencias entre variedades y al estado de desarrollo de la planta. Finalmente en un estudio desarrollado en Colombia en las montañas de la Cordillera Central, Maduell et al (2002)

encontraron en las hojas de especies del género *Piper* (Piperaceae) valores del índice Bt desde 0.030 hasta 0.480, presentándose variaciones de acuerdo con la altura sobre el nivel del mar.

De las acotaciones anteriores puede decirse entonces, al compararlas con las cifras del Cuadro 9, que las cifras encontradas en este estudio para las muestras de Sacatepéquez y Alta Verapaz, estuvieron entre los rangos reportados, aunque del lado alto. Además, y debido a lo anterior, la probabilidad de que se hubieran hecho aplicaciones comerciales del Bt en un pasado cercano, en, o cerca de, los lugares muestreados, podría calificarse como alta. El Bt es una bacteria omnipresente en el suelo de acuerdo a la opinión de muchos autores, pero las cifras encontradas en las muestras de este estudio fueron sorpresivamente altas. Si esto se debe al empleo

Cuadro 5. Resultados obtenidos para muestras de Alta Verapaz de acuerdo con la observación al microscopio con tinción azul de Coomassie.

Muestra		Colonia					Total
		1	2	3	4	5	
Hojarasca	1	-	+	+	-	-	
	2	+	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	
	4	-	-	+	-	-	
	6	-	A	B	-	-	
			+	-			
	7	-	+	-	-	-	
	8	-	-	-	+	+	
	9	+	-	+	-	-	
	10	-	+	-	-	+	12
Follaje	1	+	+	+	+	+	
	2	/	/	-	+	+	
	3	+	+	+	-	+	
	4	+	+	+	-	-	
	5	+	+	-	+	+	
	6	-	+	+	+	+	
	7	-	+	+	+	+	
	8	-	-	-	-	-	
	9	/	+	-	+	+	
	10	-	-	-	-	-	29
Suelo	1	-	+	-	-	-	
	2	-	+	+	+	-	
	3	-	+	/	-	+	
	4	+	+	+	+	+	
	5	+	+	+	-	-	
	6	-	/	+	+	-	
	7	/	+	/	+	+	
	8	+	+	+	+	+	
	9	+	+	+	+	-	
	10	+	+	+	+	-	32

(+) Cristal positivo; (-) Cristal negativo y (/) posible positivo (no fue analizada molecularmente).

Cuadro 6. Aislamientos con perfiles de bandas diferentes de los dos controles utilizados encontrados luego del análisis por medio de SSCP para muestras del primer muestreo.

Muestra	ID	Bandas					
		A0	A	B	C	D	E
Control	Dipel		x	x			x
	Positivo	6106	x	x	x	x	x
Primer Muestreo	Suelo	3S12	x	x	x		x
		9S12	x	x			x
Hojarasca		1H13	x	x	x	x	x
		3H11		x	x	x	x
		3H15		x	x	x	x
		4H11		x	x	x	x
		4H12		x	x	x	x
		4H13		x	x	x	x
		4H15		x	x	x	x
		5H12		x	x	x	x
		5H13		x	x	x	x
		5H15	x	x	x		x
		6H11	x	x	x		x
		6H14	x	x	x		x
		6H15	x	x	x		x
		8H15	x	x	x		x
	Follaje		1F11		x		
		3F11	x	x	x		x
		3F12	x	x	x		x
		3F15	x	x	x		x
		4F11	x	x	x		x
		3F15	x	x	x		x
		4F11	x	x	x		x
		4F13	x	x	x		x
		4F14	x	x	x		x
		4F15	x	x	x		x
		5F11	x	x	x		x
		5F12	x	x	x		x
		6F13	x	x	x		x
		7F12	x	x	x		x
		7F13	x	x	x		x
	7F14	x	x	x		x	
	7F15	x	x	x		x	
	8F11	x	x	x		x	
	8F14	x	x	x		x	
	9F15	x	x		x	x	
	10F11	x	x			x	
	10F13	x	x			x	

constante de productos comerciales conteniendo Bt en sistemas agrícolas productivos, y si lo que acá se encontró puede considerarse como una fotografía del resto, se presentarían dos riesgos. El primero es que se estaría provocando la inducción de resistencia en los insectos-plaga ahora susceptibles, lo cual es grave. El segundo es que se estaría poniendo en peligro la biodiversidad de cepas de Bt nativas, dada la alta prevalencia entre bacterias de una transferencia horizontal de genes.

Con base en los análisis de los variantes de cepas CP con 16S del ADN ribosomal se colocan en evidencia las observaciones siguientes: a) las muestras del suelo difirieron significativamente entre los dos lugares muestreados (Cuadro 9), de un índice de Simpson de 0.707 a uno de 0.185, lo cual indica la existencia de una mayor diversidad de variantes genéticas y una mayor abundancia de especies en la plantación de Alta Verapaz; b) lo anterior indica que esa región puede ser una rica fuente de especies nativas de

Bt; c) por otro lado al comparar los resultados entre la muestra de hojarasca de Sacatepéquez con los de hojarasca de Alta Verapaz, se observa que son significativamente diferentes con un 95% de confianza, por lo que se confirma la asociación de una mayor cantidad de variantes genéticas aisladas de la muestra de hojarasca en Antigua; y d) lo anterior puede deberse a una mayor densidad de insectos en las hojas del aguacate en Sacatepéquez.

Cuadro 7. Aislamientos con perfiles de bandas diferentes de los dos controles utilizados encontrados luego del análisis por medio de SSCP para muestras del segundo muestreo.

Muestra	ID	Bandas												
		A6	A5	A4	A3	A2	A1	A0	A	B	C	D	E	
Control Positivo	Dipel 6106								x	x			x	
Segundo Muestreo	Suelo	1S22							x	x			x	
		2S22	x	x	x		x	x	x	x			x	
		2S24							x	x	x		x	
		3S22							x	x			x	
		3S23		x	x		x		x	x		x	x	
		3S25							x	x	x		x	
		4S21							x	x	x		x	
		4S22							x	x	x		x	
		4S23							x	x	x		x	
		4S24							x	x	x		x	
		4S25							x	x	x		x	
		5S21							x	x		x	x	
		5S23							x	x	x		x	
		6S24							x	x	x		x	
		7S22							x	x	x		x	
		7S24							x	x	x		x	
		7S25							x	x	x		x	
		8S21							x	x				
		8S22				x		x	x	x				x
		8S23							x	x				
		9S21							x	x			x	x
9S22							x	x						
9S23							x	x				x		
10S21							x	x				x		
10S23							x	x			x	x		
Hojarasca	4H23							x	x		x	x		
	5H22							x	x			x		
	9H23							x	x			x		
Follaje	1F21							x	x					
	1F23							x	x		x	x		
	2F24							x	x					
	2F25							x	x					
	3F21							x	x					
	4F22							x	x		x	x		
	6F22							x	x		x	x		
	9F25							x	x					

Cuadro 8. Índice de Simpson (D) para todas las muestras

Muestreo	Muestra	N	D	1-D	IC(inf)95%	IC(sup)95%
Sacatepéquez	Suelo**	19	0,702	0,298	0,438	0,966
	Follaje	49	0,392	0,608	0,280	0,504
	Hojarasca°	30	0,223	0,777	0,153	0,293
Alta Verapaz	Suelo**	32	0,185	0,815	0,092	0,279
	Follaje	29	0,511	0,489	0,319	0,703
	Hojarasca	12	0,424	0,576	0,107	0,742

*Significativamente diferente a follaje con 95% de confianza (solo muestras 2do muestreo)

**Significativamente diferente a hojarasca con 95% de confianza (solo muestras 1er muestreo)

°Significativamente diferente a suelo del primer muestreo con un 95% de confianza

°Significativamente diferente a follaje del segundo muestreo con un 95% de confianza

Cuadro 9. Índice Bt por tipo de muestra y localización

Tipo de muestra	Sacatepéquez Colonias	Sacatepéquez Bt	Sacatepéquez Índice Bt	Alta Verapaz Colonias	Alta Verapaz Bt	Alta Verapaz Índice Bt
Hojarasca	50	30	0.60	46	12	0.26
Follaje	50	49	0.98	50	29	0.58
Suelo	50	19	0.38	50	32	0.64

BIBLIOGRAFÍA

Apaydin, O., A. Fazil; S. Harsa & H. Günes (2005) Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey **World J. Microbiol. Biotechnol.** **21**: 285-292

Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D.J. Ellis, G.M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers, & H. D. Burges (1997) Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide Distribution, Characterization, and Activity against Insect Pests **J. Invert. Pathol.** **70**: 59-68

Beron, C.M. & G. L. Salerno (2006) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control **BioControl** **51**: 779-794

BIOLOG (2003) Differentiating Gram-negative and Gram-positive Bacteria **Microlog™ Minutes.** **1**: (1) 1-5

Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F. J. Villalobos G. Peña, M.E. Nuñez-Valdez, M. Soberon, & R. Quintero (1998) Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection **Appl. Environ. Microbiol.** **64**: 4965-4972

Chatterjee, S.N., T. Bhattacharya, T.K. Danzar & G. Chandra (2007) Ecology and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in Soil Environment. **African Journal of Biotechnology** **6** (13): 1587-1591

Chattopadhyay, A.; N.B. Bhatnagar & R. Bhatnagar (2004) Bacterial Insecticidal Toxins. **Crit. Rev. Microbiol.** **30**: 33-54

Damgaard, P.H., B.M. Hansen, J.C. Pedersen & J. Eilenberg (1999) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops **J. Appl. Microbiol.** **82**: 253-258

de Maagd, R.A.; A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore, & H.E. Schnepf (2003) Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria **Annu. Rev. Genet.** **37**: 409-433

Días, S.C., M.A. Sagardoy, S.F. Silva & J.M.C.S. Días (1999) Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from Argentinean soils **BioControl** **44**: 59-71

Elliot, S.L., M.W. Sabelis, A. Janssen, L.P.S. van der Geest, E.A.M. Beerling & J. Franzen (2003) Review. Can plants use entomophagous as bodyguards? **Ecol. Letters** **3**: 228-235

Ghelardi, E.; F. Celandroni; S. Salvetti; D.J. Beecher; M. Gominet; D. Lereclus; A.C.L. Wong & S. Senesi (2002) Requirement of flhA for Swarming Differentiation, Flagellin Export, and Secretion of Virulence-Associated Proteins in *Bacillus thuringiensis* **J Bacteriol.** **184**: 6424-6433

Grundmann, H.; S. Hori & G. Tanner (2001) Determining Confidence Intervals when Measuring Genetic Diversity and the Discriminatory Abilities of Typing Methods for Microorganisms **J. Clinical Microbiology** **39**: 4190-4192

Hastowo, S., B.W. Lay & M. Ohbal (1992) Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia **J. Appl. Bacteriol.** **73**: 108-113

Hossain, M. A., S. Ahmed & S. Hoque (1997) Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* in the Agricultural Soil of Bangladesh **J. Invert. Pathol.** **70**: 221-225

Jensen, G.B., B. M. Hansen, J. Eilenberg & J. Mahillon (2003) Minireview. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives **Environ. Microbiol.** **5**: 631-640

Kaur, S. & A. Singh (2000) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* in leguminous phylloplanes in the New Delhi region of India **World J. Microbiol. Biotechnol.** **16**: 679-682

Maduell, P., R. Callejas, K.R. Cabrera, G. Armengol, & S. Orduz (2002) Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of *Piper* (Piperaceae) in three altitudinal levels **Microbial Ecol.** **44**: 144-153

Maduell, P., G. Armengol, M. Llagostera, S. Lindow & S. Orduz (2007) Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts **J. Appl. Microbiol.** **103**: 2593-2600

MAGActual (2005) Aguacate **La Revista del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación** **2**: (13) 17.
http://www.maga.gob.gt/maga_content/magactual/2005novdic/el_aguacate.htm. Acceso el 03/09/2007

Martin, P.A.W. & S. R. Travers (1989) Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates **Appl. Environ. Microbiol.** **55**: 2437-2442

Mizuki, E., T. Ichimatsu, S.-H. Hwang, Y.S. Park, H. Saitoh, K. Higuchi & M. Ohba (1999) **J. Appl. Microbiol.** **86**: 979-984

Niedmann, L. & L. Meza-Basso (2006) Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de Manejo Integrado de la Polilla Del Tomate (*Tuta Absoluta* Meyrick; *Lepidoptera: Gelechiidae*) en Chile **Agricultura Técnica (Chile)** **66**: (3) 235-246

Ohba, M. (1996) *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries **J. Appl. Bacteriol.** **80**: 56-64

Quesada-Moraga, E., E. Garcia-Tovar, P. Valverde-García, & C. S. Alvarez (2004) Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain **Microbiol. Research** **159**: 59-71

Rosas-García, N.M., M. Mireles-Martínez, J.L. Hernández-Mendoza & J.E. Ibarra (2008) Screening of cry gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from avocado orchards in México, and their insecticidal activity towards *Argyrotaenia* sp. (*Lepidoptera: Tortricidae*) larvae **J. Appl. Microbiol.** **104**: 224-230

Smith, R.A. & G.A. Couche (1991) The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants **Appl. Environ. Microbiol.** **57**: 311-315



Maricruz Álvarez Mury¹, Dinora Roche Recinos¹, Sheryl Schneider de Cabrera², Pamela Pennington de Sánchez³, Luis Andrés Arévalo Rodríguez⁴ & Carlos E. Rolz Asturias⁵

Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala:

¹Laboratorio de análisis de agua y alimentos, Centro de Estudios en Salud;

²Investigador Asociado;

³Laboratorio de Chagas, Centro de Estudios en Salud;

⁴Laboratorio de Entomología Aplicada, Centro de Estudios Agrícolas y Forestales;

⁵Decano.

droche@gt.cdc.gov

AGRADECIMIENTO

La realización de este proyecto se llevó a cabo con el financiamiento parcial del Proyecto AGROCYT 006-2005 administrado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología, SENACYT.