



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS Y DE MONTES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y RECURSOS
AGRÍCOLAS Y FORESTALES

TESIS DOCTORAL

**Evaluación de la bacteria transformada
Paenibacillus polymyxa, que expresa
la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis*,
como bioinsecticida y biofertilizante en algodón**

DIRECTORES

ENRIQUE VARGAS OSUNA

HANI K. ALDEBIS ALBUNNAI

NAHED IBRAHIM ABD EL GAHFAR

DOCTORANDA

AMAL IBRAHIM HUSSIEN IBRAHIM

Córdoba (España), julio de 2012

**TITULO: *EVALUACIÓN DE LA BACTERIA TRANSFORMADA PAENIBACILLUS
POLYMYXA, QUE EXPRESA LA TOXINA CRY1C DE BACILLUS
THURINGIENSIS, COMO BIOINSECTICIDA Y BIOFERTILIZANTE EN
ALGODON.***

AUTOR: *AMAL IBRAHIM HUSSIEN IBRAHIM*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y RECURSOS
AGRÍCOLAS Y FORESTALES

TESIS DOCTORAL

**Evaluación de la bacteria transformada
Paenibacillus polymyxa, que expresa
la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis*,
como bioinsecticida y biofertilizante en algodón**

Tesis presentada por AMAL IBRAHIM HUSSIEN IBRAHIM en satisfacción de los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba, codirigida por los Doctores Enrique Vargas Osuna y Hani K. Aldebis Albunnai, Profesores de Entomología Agrícola y Forestal del Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba, y la Doctora Nahed Ibrahim Abd El Gafar Associate professor del Departamento de Biología Molecular Microbiana del Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI), Agricultural Research Center (ARC),

El Doctorando

Amal Ibrahim Hussien

Los Directores

Dr. Enrique Vargas Osuna

Dr. Hani K. Aldebis Albunnai

Dra. Nahed Ibrahim Abd El Gafar

Córdoba, julio de 2012

ENRIQUE VARGAS OSUNA y HANI K. ALDEBIS ALBUNNAI, Profesores de Entomología Agrícola y Forestal del Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la E.T.S.I.A.M. de la Universidad de, y NAHED IBRAHIM ABD EL GAFAR, Associate professor en el Departamento de Biología Molecular Microbiana del Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI), Agricultural Research Center (ARC),

INFORMAN:

Que el trabajo “Evaluación de la bacteria transformada *Paenibacillus polymyxa*, que expresa la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis*, como bioinsecticida y biofertilizante en algodón”, realizado por AMAL IBRAHIM HUSSIEN IBRAHIM bajo nuestra dirección, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Y para que conste se firma el presente informe en Córdoba, a 24 de julio de 2012

Dr. ENRIQUE VARGAS OSUNA

Dr. HANI K. ALDEBIS ALBUNNAI

Dra. NAHED IBRAHIM ABD EL GAFAR



TÍTULO DE LA TESIS:

Evaluación de la bacteria transformada *Paenibacillus polymyxa*, que expresa la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis*, como bioinsecticida y biofertilizante en algodón

DOCTORANDO/A:

Amal Ibrahim Hussien Ibrahim

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral se ha desarrollado de acuerdo al plan de trabajo previsto y con una dedicación completa por parte del doctorando. Se ha revisado convenientemente la literatura científica relativa al tema de Tesis, se han cubierto los objetivos planteados y se han obtenido resultados de indudable valor en el contexto de la Protección de los Cultivos.

Las primeras aportaciones relevantes del trabajo de Tesis han sido publicadas en un artículo científico en revista con índice de impacto y como comunicaciones en el Congreso Nacional de Entomología Aplicada

Por todo ello, la Tesis Doctoral se considera idónea para su presentación.

Córdoba, 25 de Julio de 2012

Firma de Ips directores

Fdo. Enrique Vargas Osuna

Fdo, Hani K. Aldebis Albunnai

Fdo. Nahed Ibrahim Abd El Gafar

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de este Tesis Doctoral, y muy especialmente:

Al Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba, por haberme ofrecido los medios necesarios para la realización de la investigación.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) por la financiación de la beca de doctorado.

A mis Directores Prof., Dr. D. ENRIQUE VARGAS OSUNA, al Prof. Dr. D. HANI K. ALDEBIS ALBUNNAI, por sus excelente labor en la dirección de la Tesis, por la confianza depositada en mí desde el principio, por todo el tiempo que me ha dedicado, por sus enseñanzas y por la ayuda, tan amablemente ofrecida en todo momento hasta la finalización de este trabajo, y a la Prof. Dra. NAHED IBRAHIM ABD EL GAFAR, Associate professor en Agricultural Research Center (ARC), Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI).

Muy especialmente agradecer a los Profesores Doctores de Egypt de mi centro de trabajo, Central Agricultural Pesticide Laboratory (CAPL), Waffa, Iman, Saida, Manal y otros, gracias por todo.

A mis compañeros/as y amigos/as Sergio, Halima, Rania, Iman, Yomna, Rana, Priscila, Amina, Nabila, y al resto de los amigos/as con quien he tenido la ocasión de compartir buenos momentos.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi marido (Adel) por estar siempre a mi lado animandome y apoyandome, y también a mis niños (Ibrahim y Hamza).

Y, por supuesto, muchísimas gracias a mis padres, mis hermanos, hermanas y sus familias, quienes no han podido estar aquí pero hoy se alegran conmigo por este día y a quienes no citaré pues me resultaría difícil hacer una enumeración completa y no me perdonaría olvidarme de ninguno.

A todos, gracias.

RESUMEN

Spodoptera littoralis (Boisduval) es un lepidóptero de la familia Noctuidae cuyas larvas se desarrollan a expensas de numerosas plantas, causando daños importantes en cultivos del área mediterránea como algodón, alfalfa y hortalizas, entre otros. Con objeto de desarrollar nuevas materias activas que puedan sustituir a los actuales insecticidas químicos de síntesis, la bacteria esporígena *Bacillus thuringiensis* constituye un recurso natural que se comercializa como insecticida biológico, utilizando como ingrediente activo la toxicidad selectiva por ingestión de δ -endotoxinas constituyentes del cristal parasporal, conocidas como proteínas Cry. Para mejorar la limitada persistencia y estabilidad en campo de los preparados comerciales de *B. thuringiensis* se han desarrollado técnicas que permiten la inserción de los genes *cry* (que expresan proteínas Cry específicas) en organismos con capacidad de colonizar la planta huésped del fitófago.

En este estudio se ha evaluado el potencial insecticida de una bacteria fijadora de Nitrógeno, *Paenibacillus polymyxa*, que incorpora el gen de *cry1C* (que expresa Cry1C, una de las proteínas de *B. thuringiensis* más tóxicas para *S. littoralis*).

En primer lugar, mediante bioensayos de actividad biológica en laboratorio, se ha determinado la toxicidad de la bacteria *P. polymyxa* transformada y se ha visto que es comparable a la de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, que contiene de forma natural el gen *cry1C*.

Se han estudiado los posibles efectos en el desarrollo y reproducción de *S. littoralis* en los supervivientes a la ingestión de dosis subletales. Las larvas tratadas con *P. polymyxa* transformada y con *B. thuringiensis* var. *aizawai* muestran un notable incremento en el tiempo de desarrollo larvario, disminución del peso de las pupas y reducción del porcentaje de viabilidad de huevos.

También se ha evaluado otras propiedades que repercuten en la eficacia insecticida, como el tiempo de persistencia en la planta después de su aplicación y la supervivencia de la bacteria en el tejido vegetal. Ensayos con plantas de algodón bajo condiciones de campo, se ha comprobado que la bacteria transformada *P. polymyxa* mantiene la actividad insecticida al menos durante 30 días después de la pulverización foliar de suspensiones de cristales y esporas. Esta alta persistencia de toxicidad se confirma también en condiciones de umbráculo y de invernadero, en donde no difiere de

la persistencia de *B. thuringiensis* var. *aizawai*. La presencia de la toxina Cry1C en el interior de los tejidos se ha confirmado por SDS-PAGE y la presencia de la bacteria mediante la detección del gen *cry1C* por PCR.

Se ha evaluado también la capacidad de desarrollo de resistencia de las poblaciones de *S. littoralis*, durante 12 generaciones de selección para resistencia a *P. polymyxa* transformada, en comparación con una población seleccionada para resistencia a *B. thuringiensis* var. *aizawai* y una tercera no seleccionada. La población seleccionada para resistencia a *B. thuringiensis* var. *aizawai* no mostró cambios en susceptibilidad a la acción letal de la bacteria, aunque ensayos de desarrollo y reproducción detectaron reducción del periodo de desarrollo y disminución en la viabilidad de huevos. Por otro lado, durante 12 generaciones de selección para resistencia a *P. polymyxa* transformada se observó una progresiva reducción de la susceptibilidad larvaria hasta alcanzar en un factor de resistencia de 5,47 respecto de la población no seleccionada. La población tolerante se caracterizó biológicamente por un mayor peso de las pupas, aumento de la fecundidad de hembras y menor porcentaje de viabilidad de huevos.

Por último, se han realizado ensayos con plantas de algodón para conocer si la transformación de la bacteria mediante la incorporación del gen *cry1C* no afecta a las características de esta bacteria como fijadora de Nitrógeno y biofertilizante. La aplicación en suelo de *P. polymyxa* transformada produjo un aumento de la actividad nitrogenasa así como un mayor contenido de Nitrógeno en las plantas inoculadas, incluso en mayor medida que *P. polymyxa* no transformada. Los niveles de clorofila y carotenoides aumentaron progresivamente durante cuatro semanas después de la inoculación con *P. polymyxa* transformada, de forma similar al efecto de *P. polymyxa* no transformada.

SUMMARY

Spodoptera littoralis (Boisduval) is a lepidopterous belonging to the family Noctuidae whose larvae feed on many plants, causing significant damage to crops in the Mediterranean area as cotton, alfalfa and vegetables, among others. In order to develop new active ingredients that can replace existing synthetic chemical insecticide, the *Bacillus thuringiensis* sporigenic bacteria is a natural resource that is marketed as biological insecticide, using as active ingredient the selective toxicity by ingestion of δ -endotoxins, known as Cry proteins, which forms the parasporal crystals. In order to improve the limited persistence and stability in the field of *B. thuringiensis* commercial preparations, techniques that allow the insertion of the *cry* genes (which express specific Cry proteins) in organisms capable of colonizing the phytophagous host plant have been developed.

In this study we have evaluated the potential insecticide from a nitrogen-fixing bacterium, *Paenibacillus polymyxa*, which incorporates the *cry1C* gene (expressing Cry1C, one from the more toxic *B. thuringiensis* proteins against *S. littoralis*).

First, by bioassays of biological activity in laboratory, we have determined that the toxicity of the transformed *P. polymyxa* is comparable with the *B. thuringiensis* var. *aizawai* which naturally contains the gene *cry1C*.

We have studied the possible effects on *S. littoralis* development and reproduction in survivors of sublethal doses. Larvae treated with transformed *P. polymyxa* and with *B. thuringiensis* var. *aizawai* show a marked increase in larval development time, reduced pupal weight and reduction in egg-viability. We also evaluated other properties affecting the insecticidal efficacy, such as persistence time after application and the survival of bacteria in vegetal tissues. By assays with cotton plants under field conditions, it was found that insecticidal activity of transformed *P. polymyxa* remains at least 30 days after foliar spray of crystals and spores suspensions. This high persistence of toxicity is also confirmed in semi-field and greenhouse conditions, where no different from the persistence of *B. thuringiensis* var. *aizawai*. The presence of the toxin Cry1C within tissues has been confirmed by SDS-PAGE and the presence of bacteria by detecting *cry1C* gene by PCR. It has also assessed the ability of developing resistance populations of *S. littoralis* for 12 generations of selection for resistance to transformed *P. polymyxa* compared with the

population selected to *B. thuringiensis* var. *aizawai* and untreated population. The population selected for resistance to *B. thuringiensis* var. *aizawai* showed that there are no changes in susceptibility to the bacteria, although the bioassays of growth and reproduction indicated reduction of development period and decreased egg-viability. On the other hand, during 12 generations of selection for resistance to transformed *P. polymyxa* showed a progressive reduction of larval susceptibility to reach a 5.47 resistance factor with respect to untreated population. The tolerant population was characterized biologically by increased pupal weight, increased female fecundity and lower percentage of viable eggs.

Finally, studies have been conducted with cotton plants to determine if the transformation of the bacteria (incorporating the cry1C gene) not affected on the characteristics of this bacterium as nitrogen-fixing and biofertilizer. The soil treated with the transformed *P. polymyxa* resulted in increased either in nitrogenase activity and in nitrogen content in treated plants, more than untransformed *P. polymyxa*. The levels of chlorophyll and carotenoid progressively increased until four weeks after treated with transformed *P. polymyxa*, similarly to the effect of untransformed *P. polymyxa*.

Índice General

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. <i>Spodoptera littoralis</i>	3
2.1.1. Origen y distribución geográfica.....	3
2.1.2. Ciclo biológicos.....	4
2.1.3. Importancia económica	5
2.1.4. Métodos de control.....	5
2.1.4.1. Control químico	6
2.1.4.2. Control biológico	6
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
2.2.1. Características generales	10
2.2.2. Distribución, hábitat y ecología.....	11
2.2.3. Situación taxonómica y clasificación	12
2.2.4. Biología	14
2.2.5. Las toxinas.....	16
2.2.6. Las δ -endotoxinas (proteínas Cry)	17
2.2.7. Mecanismo de acción las proteínas Cry	18
2.2.8. Los genes codifican las proteínas Cry.....	21
2.2.9. Aplicaciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> como insecticida	22
2.2.10. La resistencia a <i>B. thuringiensis</i>	25
2.3. <i>Paenibacillus (Bacillus) polymyxa</i>	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. <i>Spodoptera littoralis</i>	31
3.1.1. Procedencia	31
3.1.2. Método de cría.....	31
3.2. Las bacterias.....	32
3.3. Métodos para determinar la actividad insecticida.....	33
3.3.1. Obtención de los inóculos	33
3.3.2. Riqueza en esporas y cristales de las suspensiones.....	33
3.3.3. Métodos de bioensayos	34
3.3.3.1. Efecto letal	34
3.3.3.2. Efectos subletales.....	35

3.4. Métodos para determinar la persistencia de la actividad insecticida.....	36
3.4.1. Tratamiento de las plantas	36
3.4.1.1. En campo	36
3.4.1.2. En condiciones de semicampo e invernadero.....	37
3.4.2. Evaluación de la toxicidad	38
3.5. Métodos para determinar la supervivencia en el interior del tejido vegetal ...	38
3.6. Detección de las bacterias en los tejidos foliares	39
3.6.1. Detección de Cry1C por SDS-PAGE.....	39
3.6.2. Detección del gen <i>cry1C</i> por PCR	41
3.7. Selección de resistencia de <i>S. littoralis</i> a las bacterias.....	43
3.7.1. Susceptibilidad	43
3.7.2. Potencial biológico de las poblaciones seleccionadas.....	44
3.8. Influencia de la <i>Paenibacillus polymyxa</i> sobre la planta	44
3.8.1. Fijación de nitrógeno en planta	44
3.8.2. Actividad nitrogenasa en suelo.....	44
3.8.3. Contenido en clorofila y carotenoides.....	45
3.9. Análisis estadísticos	46
3.9.1. Análisis de regresión Probit	46
3.9.2. Análisis de la varianza.....	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Actividad insecticida.....	49
4.1.1. Efecto letal.....	49
4.1.2. Efectos de dosis subletales de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> y <i>Paenibacillus polymyxa</i> transformada en larvas de primer estadio de <i>Spodoptera littoralis</i>	50
4.2. Persistencia de la actividad insecticida y supervivencia en hojas de algodón de <i>Paenibacillus polymyxa</i> transformado y su comparación con las otras dos cepas	56
4.2.1. En condiciones de campo	56
4.2.2. En condiciones de semicampo (umbráculo).....	57
4.2.3. En condiciones de invernadero.....	59
4.2.4. Detección de las bacterias en los tejidos foliares.	61
4.2.4.1. Análisis de proteínas.....	61
4.2.4.2 Análisis del <i>cry1C</i>	63

4.3. Selección de resistencia en poblaciones de <i>S. littoralis</i>	65
4.3.1. Susceptibilidad de las larvas en sucesivas generaciones de selección	65
4.3.2. Evolución de la susceptibilidad a <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> en sucesivas generaciones de selección para resistencia.....	70
4.3.3. Evolución de la susceptibilidad a <i>Paenibacillus polymyxa</i> transformada en sucesivas generaciones de selección para resistencia.....	71
4.3.4. Potencial biológico de las poblaciones seleccionadas.....	73
4.4. Influencia en la planta de la <i>Paenibacillus polymyxa</i> natural y transformada.....	79
4.4.1. Contenido y fijación de Nitrógeno	79
4.4.2. Niveles de clorofila y carotenoides	81
5. DISCUSIÓN.....	87
5.1. Actividad insecticida.....	87
5.2. Persistencia de la actividad insecticida en hojas de algodón	90
5.3. Supervivencia en el interior del tejido foliar.....	91
5.4. Selección de poblaciones de <i>S. littoralis</i> resistentes	92
5.5. Influencia de la <i>Paenibacillus polymyxa</i> en la planta	94
6. CONCLUSIONES.....	95
7. BIBLIOGRAFÍA	97

1. Introducción y objetivos

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Numerosos cultivos, entre los que se encuentran algodón, alfalfa y hortícolas, se ven afectados en la región mediterránea por los daños causados por las larvas filófagas del lepidóptero *Spodoptera littoralis* (Boisduval), contra las que se realizan reiteradas aplicaciones con insecticidas químicos poco selectivos con las consecuencias adversas al ecosistema y el desarrollo de poblaciones resistentes. Se hace necesario el estudio de nuevas materias activas que por sus cualidades de eficacia y seguridad medioambiental puedan sustituir a los actuales insecticidas para el control de esta especie.

Bacillus thuringiensis es una bacteria cuyo efecto insecticida se conoce desde hace tiempo. Actualmente se han desarrollado y comercializado insecticidas que contienen como ingrediente activo mezclas de cristales y esporas de cepas naturales para el control de numerosas plagas agrícolas, forestales y médico-veterinarias. Su rapidez de acción es comparable al de los insecticidas químicos convencionales, dado que el efecto letal es de naturaleza tóxica, motivado por la acción de proteínas Cry sobre las células columnares del tubo digestivo del insecto.

El conocimiento de la genética de esta bacteria y los avances en biología molecular permiten hoy día el desarrollo de su máxima potencialidad como insecticida mediante manipulación de genes *cry* (que codifican determinadas toxinas) para obtener organismos genéticamente modificados que puedan ampliar su espectro de actividad, aumentar su toxicidad y mejorar la persistencia.

Un problema relacionado con los preparados comerciales a base de *B. thuringiensis* es su limitada persistencia y estabilidad en campo y para paliar este inconveniente se han puesto en práctica técnicas de inserción de genes *cry* específicos en otros organismos con capacidad de colonizar la planta huésped del fitófago, de tal manera que los organismos transformados puedan sintetizar cantidades suficientes de proteína Cry para controlar los daños causados por el insecto.

Sin embargo, la introducción de genes *cry* en bacterias distintas a *B. thuringiensis* acarrea inconvenientes debido a la inestabilidad de la característica introducida. La utilización de bacterias próximas taxonómicamente permite solventar estos inconvenientes y reducir los problemas asociados a la expresión de los genes *cry*. Además, se ha visto que cepas transformadas de *B. megaterium*; *B. subtilis* y *B. licheniforme* que expresan proteínas Cry específicas pueden tener una persistencia prolongada y mejorar su eficacia insecticida.

A partir de la bacteria fijadora de Nitrógeno *Paenibacillus polymyxa*, que habita la rizosfera, se ha construido una cepa transformada que expresa la proteína Cry1C, una de las más activas contra *S. littoralis*. Para valorar el potencial de esta bacteria como agente de control es necesario estudiar su toxicidad sobre la población tratada, no sólo en su efecto letal, sino también en las posibles alteraciones que se manifiesten a más largo plazo en los individuos supervivientes al tratamiento (efectos subletales). También se requiere evaluar otras propiedades que le confieren mayor eficacia insecticida, como el tiempo de persistencia en la planta después de su aplicación y el posible desarrollo de poblaciones de *S. littoralis* resistentes. Por último, la transformación de la bacteria mediante la incorporación del gen *cry1C* no debería afectar a las características de esta bacteria como fijadora de Nitrógeno y biofertilizante.

Los objetivos específicos del presente trabajo han sido:

1. Actividad insecticida en larvas de *S. littoralis* de la bacteria transformada *P. polymyxa* en comparación con la actividad de *B. thuringiensis* var. *aizawai* (que expresa la misma toxina Cry1C de forma natural) y con *P. polymyxa* sin transformar.
 - 1.1. Efecto letal: relación dosis-mortalidad y concentraciones letales medias.
 - 1.3. Efectos subletales en desarrollo y reproducción.
2. Persistencia en hojas de algodón de las bacterias después de pulverizaciones foliares de una mezcla de cristales y esporas en condiciones de campo, semicampo e invernadero.
 - 2.1. Evolución temporal de la toxicidad en larvas de *S. littoralis*.
 - 2.2. Supervivencia de las bacterias en el interior del tejido foliar.
3. Selección de poblaciones de *S. littoralis* para resistencia a *P. polymyxa* transformada y a *B. thuringiensis* var. *aizawai*
 - 3.1. Evolución de la susceptibilidad larvaria en sucesivas generaciones de selección.
 - 3.2. Potencial biológico de las poblaciones seleccionadas.
4. Efectos en las plantas inoculadas con *P. polymyxa* transformada, en comparación con la bacteria sin transformar.
 - 4.1. Fijación y contenido de Nitrógeno.
 - 4.2. Niveles de clorofila y carotenoides.

2. Revisión Bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Spodoptera littoralis*

El lepidóptero *Spodoptera littoralis* (Boisduval 1833), perteneciente a la Familia Noctuidae, es conocida en España con el nombre común de “la rosquilla negra” y en inglés como, African Cotton Leafworm, Egyptian Cotton Leafworm, entre otros.

Las especies incluidas actualmente en el género *Spodoptera* estuvieron agrupadas en tres géneros diferentes: *Spodoptera*, *Laphygma* y *Prodenia*, hasta que en 1963 Viette comparando las genitalias de estos tres géneros concluyó que todas las especies podrían estar reunidas en un sólo género. Este mismo autor comprobó que el nombre de *Prodenia litura* Fabricius se aplicaba realmente a dos especies distintas, que fueron separadas y denominadas *Spodoptera litura* (Fabricius) y *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Brown y Dewhurst, 1975).

La descripción de esta especie ha sido detallada en varias publicaciones, en donde se caracterizan morfológicamente todos sus estados de desarrollo, huevo, larva, pupa y adulto (Gómez Clemente y del Rivero, 195; Cayrol, 1972; Domínguez, 1993; Gómez de Aizpúrua y Arroyo Varela, 1994) (Figura 1).



Figura 1. Macho adulto, hembra adulta, y larvas de último estadio de *Spodoptera littoralis* (de izquierda a derecha).

2.1.1 Origen y distribución geográfica

La especie *S. littoralis* es originaria de África y está ampliamente distribuida tanto en este Continente como en toda la cuenca mediterránea, desde España hasta el Golfo Pérsico. Posiblemente con el transporte de material vegetal ha llegado hasta Gran Bretaña y al centro y

norte de Europa continental, cuya presencia se ha observado en invernaderos (Carter, 1984). Espinosa y Hodges, (2009) señalan que ha sido interceptada en puertos de Estados Unidos pero no hay constancia de que se haya establecido en Norte America.

S. littoralis se detectó por primera vez como grave plaga el año 1877 en Egipto, sobre el cultivo de algodón (Bishara y El Zoheiry, 1940). En España las primeras referencias de su presencia son las de Ribbe, (1909-1912). En 1937 ya se informó de su presencia como plaga de los cultivos de Almería que posteriormente se propagó a otras provincias andaluzas (Mendizábal, 1940). Sus daños se han citado también en Extremadura, Castilla-La Mancha, Aragón, Cataluña, Baleares y Canarias (Gómez Clemente y del Rivero, 1951; Domínguez, 1993; Gómez de Aizpúrua y Arroyo Varela, 1994).

2.1.2. Ciclo biológico

Las hembras depositan los huevos en forma de plastones alargados (20-500 huevos/plastón) recubriéndolos con una capa protectora de aspecto algodonoso. Cada hembra pone durante su vida alrededor de 3000 huevos y el periodo de incubación de éstos oscila entre 3 y 26 días, dependiendo de la temperatura (Carter, 1984).

El desarrollo de las larvas consta de seis estadios, que en condiciones de campo se completan en aproximadamente 33 días (Cayrol, 1972). Las larvas son gregarias hasta el segundo o tercer estadio larvario y posteriormente se separan y dispersan (Gómez de Aizpúrua y Arroyo Varela, 1994). Su actividad alimenticia la realizan trepando por la planta principalmente durante la noche o en los días nublados huyendo de las horas de más calor. La máxima voracidad se manifiesta en el último estadio (Domínguez, 1993). Al completar el desarrollo larvario y pupan en el suelo, encerradas en una cámara terrosa a escasos centímetros de profundidad (Cayrol, 1972), siendo la temperatura un factor importante en la duración del estado de pupa. Los adultos emergidos tienen una rápida maduración sexual, siendo capaces de copular y poner huevos fértiles a las 48 horas.

En climas cálidos, como en los países del Mediterráneo, esta especie puede llegar a tener hasta siete generaciones al año. En España se admite que tiene tres generaciones, pudiendo completar alguna más en zonas cálidas de Levante y Andalucía. Sin embargo, la comprobación del número de generaciones se complica en algunas zonas debido al carácter migratorio de la especie (Gómez de Aizpúrua y Arroyo Varela, 1994). En climas fríos, como en el centro y norte de Europa, sólo pueden sobrevivir en invernaderos (Carter, 1984).

2.1.3. Importancia económica

La importancia económica de *S. littoralis*, puesta de manifiesto en numerosos trabajos (Cayrol, 1972; Cayrol *et al.*, 1974; Gómez-Bustillo *et al.*, 1979; Cabello, 1988; Cabello y Belda, 1994), deriva de su elevada polifagia, tendencia al gregarismo y comportamiento migratorio.

Es una especie extremadamente polífaga pues sus plantas hospedadoras pertenecen a más de 40 familias botánicas con al menos 87 especies de interés económico, tanto cultivadas como ornamentales (Moussa *et al.*, 1960; Brown y Dewhurst, 1975). Entre las plantas cultivadas se encuentran: remolacha, algodón, girasol, col, melón, pepino, arroz, maíz, alfalfa, espinacas, habas, lentejas, garbanzos, judías, ajos, naranjo, berenjena, pimiento, tabaco, melocotonero, peral, manzana, fresa, gladiolo, tomate, patata y vid (Brown y Dewhurst, 1975).

Gran importancia tiene esta especie en Egipto y el norte de África, siendo una de las plagas más temidas por la repercusión económica de sus daños, principalmente en el cultivo de algodón, maíz, y alfalfa (Cayrol, 1972; Moussa *et al.*, 1960; Hatem, 2001). En Extremo Oriente los daños se señalan sobre todo en tabaco, arroz, ricino y morera (Cayrol, 1972). En España se la puede encontrar en multitud de cultivos, tanto herbáceos como leñosos, ocasionando en muchos casos daños de consideración. Entre estos cultivos podemos citar: patatas, tabaco, maíz, alfalfa, pimientos y plantas hortícolas en general (Gómez Clemente y del Rivero, 1951; Domínguez, 1993).

2.1.4. Métodos de control

La lucha tradicional contra *S. littoralis* se ha basado en métodos mecánicos, culturales y químicos. Los primeros consistían en la recogida de larvas y plastrones y su posterior destrucción, mientras que los métodos culturales se basaban en el control de malas hierbas y labores en campos con fuertes infestaciones (Gómez Clemente y del Rivero, 1951; Domínguez, 1993). Posteriormente se generalizó el uso de insecticidas químicos que sigue siendo en la actualidad el método más utilizado, si bien hoy día se tiende a la compatibilidad de diferentes agentes de lucha para reducir eficazmente las poblaciones larvarias con el menor impacto medioambiental en el contexto del Control Integrado de Plagas.

2.1.4.1. Control químico

La aplicación de insecticidas químicos de síntesis sigue siendo el principal método para el control de esta especie. Sin embargo, la utilización continuada y exclusiva de éstos ha provocado la aparición de poblaciones resistentes a numerosas materias activas y a la limitación de sus propios enemigos naturales (El-Guindy *et al.*, 1983; Wene y Sheets, 1961; El Zimety *et al.*, 2003). En consonancia con el esfuerzo que se está haciendo para el uso de materias activas que además de ser eficaces sean más selectivas, se utilizan insecticidas del grupo de los reguladores del crecimiento de los insectos (RCI), en particular los inhibidores de la síntesis de quitina, algunos de los cuales están recomendados para el control de *S. littoralis* (De Liñán, 2012). Sin embargo, estos productos tampoco están exentos del desarrollo de resistencias (Ishaaya y Klein, 1990).

Existe la necesidad de mejorar la eficacia insecticida con nuevas materias activas que sean más selectivas y más respetuosas con el medio ambiente. Es por ello que se está dando cada vez más importancia al uso de insecticidas origen natural, como Piretrinas, Azadiractina (Gómez de Aizpúrua y Arroyo Varela, 1994), Spinosad (Lechuga *et al.*, 2004), o sustancias antiapetitivas procedentes de extractos vegetales, como extractos de malas hierbas (Hattem *et al.*, 2009), así como también la aplicación de productos en cebos que incluyen estimulantes alimenticios como la harina de semilla de algodón, lecitina de soja, sacarosa, etc.

2.1.4.2. Control biológico

El uso irracional de los insecticidas químicos de síntesis ha sido causa del desequilibrio de las poblaciones en los ecosistemas, de la disminución de la biodiversidad, mientras que sus residuos tóxicos han contaminado los alimentos e inducido resistencia en los insectos fitófagos (Dulmage *et al.*, 1990; Karamanlidou *et al.*, 1991; Badii *et al.*, 1996). Esto plantea la necesidad de contar con herramientas seguras y efectivas, basadas en el desarrollo de medidas de control alternativas, ecológicamente menos agresivas y por tanto de mayor interés para la protección integrada que es la tendencia actual en la lucha contra plagas. Una de estas alternativas es el control biológico, en donde se utilizan materias activas más selectivas y se emplean como agentes de control los enemigos naturales del propio fitófago, tanto parasitoides, depredadores o patógenos presentes en las poblaciones naturales.

Dada la importancia económica de *S. littoralis* no es de extrañar que sea amplio el registro de estos enemigos naturales que contribuyen al control biológico natural de sus poblaciones y que pueden ser candidatos para ser utilizados en programas de control biológico de esta especie.

En relación a los depredadores, existe una amplia diversidad de especies que pueden atacar a este noctuido en su área de distribución (Gómez de Aizpúrua y Arroyo Varela, 1994), entre las que destacan el neuróptero *Chrysoperla carnea* (Stephens) y el coleóptero cocinélido *Coccinella undecimpunctata* (L.), así como carábidos pertenecientes a los géneros *Rhopalomelus* y *Calosoma* (Salama *et al.*, 1982). También se citan hemípteros, como el mírido *Deraeocoris pallens* (Reuther), que se alimenta de larvas de los primeros estadios (Kolaib *et al.*, 1990; Salem y Matter, 1991), el pentatómido *Podisus maculiventris* (Say) y el reduvídido *Coranus africana* (El-Sebaey) (El-Sebaey, 2001; Down *et al.*, 2004).

En cuanto a parasitoides, numerosas especies utilizan a *S. littoralis* como huésped en diferentes agroecosistemas. Hafez *et al.* (1976) y Herting y Simmonds, (1976) citan 57 especies de parasitoides que pertenecen a 7 familias de los órdenes Hymenoptera (Ichneumonidae, Braconidae, Chalcididae, Encyrtidae, Pteromalidae, Eulophidae y Trichogrammatidae) y Diptera (Sarcophagidae y Tachinidae), destacando las familias Ichneumonidae y Braconidae. En el Sur de España las especies más frecuentes son los parasitoides de larvas, *Meteorus pulchricornis* (Wesmael) (Hym., Braconidae) e *Hyposoter didymator* (Thünberg) (Hym., Ichneumonidae) (Caballero *et al.*, 1990). También se han encontrado ácaros parásitos, como los de la familia Phytoseiidae del suborden Gamasida y los de la familia Stigmaeidae del suborden Actinedida (Gómez de Aizpúrua y Arroyo Varela, 1994). Alguno de los parasitoides asociados a las poblaciones naturales de *S. littoralis* están siendo desarrollados para su utilización como agentes de control, tal es el caso del ichneumonido *Microplitis rufiventris* (Kok.) (Abdel-Rahman *et al.*, 2000; Khafagi y Hegazi, 2004).

Los entomopatógenos contribuyen también a la regulación natural de las poblaciones de insectos (Badii *et al.*, 1996). Por norma general, la incidencia de las enfermedades suele ser baja (estado enzoótico), pudiendo alcanzar de forma esporádica el estado de epizootia cuando interactúan de forma favorable factores relacionados con el patógeno, el hospedador, mecanismos de transmisión y el medio (Benz, 1987).

Los virus aislados de poblaciones larvarias de *S. littoralis* pertenecen a la familia Baculoviridae: *Nucleopolyedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV) (Martignoni e Iwai, 1986). La mayoría de los aislamientos proceden de poblaciones de Egipto, Marruecos e Israel (Abul-

Nasr, 1956; Abul-Nasr y El-Nagar, 1980; Kislev y Edelman, 1982). Algunos de los aislamientos han sido caracterizados y su actividad insecticida evaluada en ensayos de laboratorio y de campo (Abul-Nasr y El-Nagar, 1980; Jones y McKinley, 1986; Vargas-Osuna y Santiago-Álvarez, 1988; Hatem *et al.*, 2011).

En larvas de *S. littoralis* se han encontrado las bacterias *Bacillus thuringiensis* (Berliner) y *Serratia marcescens* (Bizio), los hongos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) y *Erynia gammae* (Weiser) Glare & Milner y el protozoo *Pleistophora schubergi noctuidae* (Veremtchuk e Issi) (Gómez de Aizpúrua y Arroyo Varela, 1994)

En Egipto se han identificado también los nematodos *Heterorhabditis indicus* Poinar, *H. bacteriophora* Poinar, *H. heliothidis* (Khan, Brooks y Hirschmann) y *Steinernema carpocapsae* (Weiser) asociados a larvas de *S. littoralis* y causando altos niveles de mortalidad (Shamseldean *et al.*, 1998, 1999; El-Kifl, 1991; Abdel-Razek, 2006). Especial atención ha merecido *S. carpocapsae* cuya relación con las larvas hospedantes ha sido estudiada por Navon *et al.* (2002). Estos nematodos, de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, causan un efecto letal en las larvas de insectos como consecuencia de la relación simbiótica con bacterias del género *Xenorhabdus*, las cuales generan septicemia en el insecto parasitado por el nematodo (Kaya, 1993).

En España, el único patógeno aislado de larvas de esta especie es el hongo entomofitoráceo *Erynia gammae* (Weiser) (Santiago-Álvarez, 1991).

Existen insecticidas microbianos comercializados que usan de ingrediente activo *B. thuringiensis* o baculovirus. En concreto, la bacteria *B. thuringiensis* ha alcanzado la fase comercial con una eficacia comparable a la de los productos de síntesis (Beegle y Yamamoto, 1992), por lo que hay en el mercado biopreparados con el complejo espora-cristal de *B. thuringiensis* de las subespecies *kurstaki* y *aizawai* para combatir las plagas de *S. littoralis* tanto en cultivo bajo plástico como al aire libre (De Liñán, 2012).

2.2. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es el insecticida biológico más aplicado en el mundo y se utiliza para controlar diversos insectos que afectan la agricultura, la actividad forestal y que transmiten patógenos humanos y animales. Esa bacteria ha constituido durante las últimas décadas un tema de investigación intensiva, cuyo esfuerzo ha permitido el conocimiento de aspectos importantes sobre las relaciones entre la estructura, el mecanismo de acción y la genética de

sus cristales proteicos con acción insecticida. Otros estudios se han centrado en el rol ecológico de los cristales de *B. thuringiensis* y su funcionamiento en ecosistemas agrícolas y naturales. Teniendo como base todo el conocimiento generado y las herramientas biotecnológicas disponibles, las investigaciones están ahora alcanzando resultados prometedores en el desarrollo de toxinas más útiles, bacterias recombinantes, nuevas formulaciones y plantas transgénicas que expresan actividad insecticida, con el objetivo de asegurar que estos productos sean utilizados con un mayor beneficio y eficacia.

Esta bacteria fue aislada por primera vez de larvas del gusano de seda (*Bombyx mori*) por el japonés Ishiwata en 1901, dándole el nombre *Bacillus soto* (Ishiwata, 1901). Diez años después, el entomólogo alemán Berliner la aisló de larvas de la polilla de la harina *Ephestia kueheniela* (Zeller) en la región de Thuringia (Alemania) y fue este mismo investigador quien cuatro años después asignó a la especie el nombre de *Bacillus thuringiensis* Berliner con el que hoy la conocemos (Berliner, 1915). Entre 1920 y 1930 se realizaron los primeros ensayos para el control de plagas, tales como *Lymantria dispar* (L.) y *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Metalnikov y Chorine, 1929). El desarrollo de las primeras formulaciones bioinsecticidas basadas en este microorganismo se inició en 1938 (Sporeine) en Francia, pero no fue hasta el inicio de los años 60 cuando, con la comercialización de Thuricide, cuando comenzaron a realizarse numerosas aplicaciones en campo que condujeron, hacia mediados de los 80, a la general aceptación de *B. thuringiensis* como insecticida.

Hoy día los productos basados en esta bacteria son considerados entre los insecticidas más seguros, debido a su nula toxicidad para vertebrados, y han sido explotados comercialmente para controlar gran variedad de especies de importancia agrícola, forestal y médico-veterinaria, autorizándose su empleo sobre numerosos cultivos, incluso sin imposición de plazos de seguridad. Sin embargo, el uso de estos productos presenta limitaciones debido al rápido descenso de la eficacia en aplicación foliar a causa de la inactivación por los rayos UV, a que no afecta a insectos de hábitat endófito y rizófagos (Cerón, 2004), ya que actúa exclusivamente por ingestión, y a la baja persistencia en el suelo debido a la degradación microbiana. Estos inconvenientes se están intentando solucionar gracias a los avances biotecnológicos y a la biología molecular, mediante la introducción de genes que codifican las proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* en bacterias recombinantes (Turner *et al.*, 1991; Obukowicz *et al.*, 1986; Waalwijk *et al.*, 1991) o en plantas transgénicas (Federico, 2002).

2.2.1. Características generales

B. thuringiensis es un bacilo gram-positivo que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho y posee flagelos cortos peritricos. Se sitúa en el grupo 1 del género *Bacillus* (“grupo de *B. cereus*”), donde se encuentran aquellas especies que desarrollan esporas elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (Figura 2) (Gordon *et al.*, 1973). Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganotrofo con actividad de la catalasa (Sneath, 1986) y con capacidad para fermentar glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina.

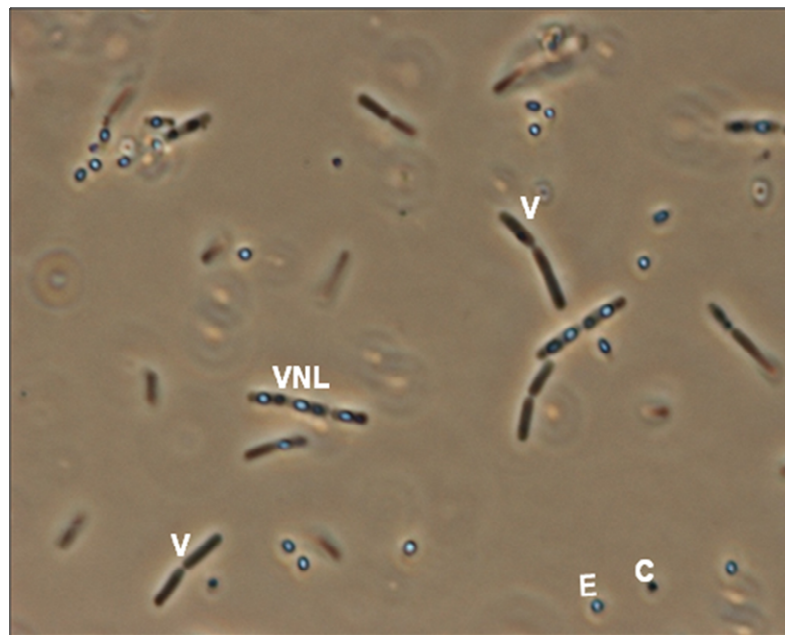


Figura 2. Cultivo tardío de *B. thuringiensis*. VNL: Células vegetativas no lisadas. V: célula vegetativa. E: Espora. C: Cristal parasporal. (Cepa BtDI aislada de *Dryobota labecula*).

Esta bacteria está estrechamente emparentada con otras del mismo género; sin embargo, la característica principal que la diferencia del resto de bacilos relacionados es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para invertebrados, especialmente larvas de insectos (Schenepf *et al.*, 1998). Estas proteínas denominadas δ -endotoxinas, llamadas también Cry (del inglés, Crystal), pueden presentar en función de su composición distintas formas: bipiramidal, cúbica, prismática rectangular, esférica y otras formas atípicas menos frecuentes (Figura 3) (Khetan, 2001).

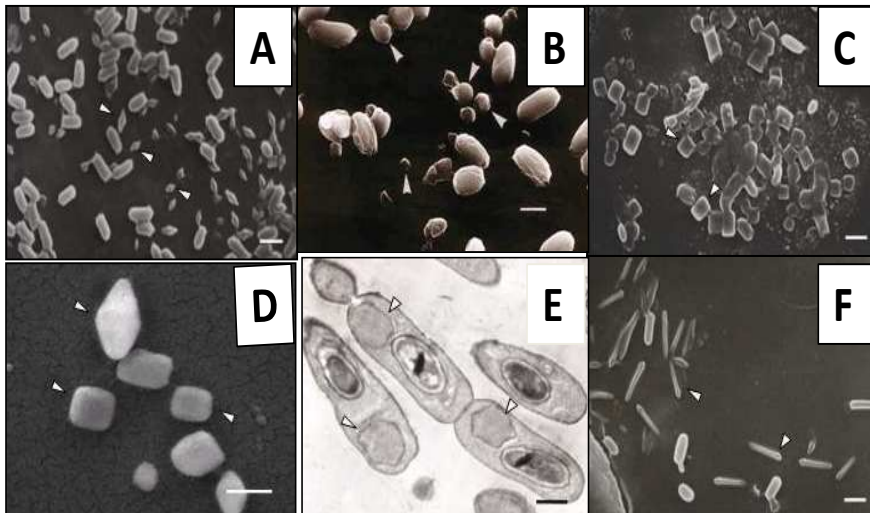


Figura 3. Cristales parasporales de *B. thuringiensis*. con diferentes morfologías A: bipyramidales; B ovoides; C: cúbicos aplastados; D: bipyramidales y cúbicos; E: amorfos; F: en forma de barras. Barra en A, B, C, D y F: 1 mm; barra en E: 0,5 mm (Tomado de Alejandro Mentaberry, 2011)

2.2.2. Distribución, hábitat y ecología

B. thuringiensis es un organismo cosmopolita, tanto por la distribución geográfica como por la gran diversidad de hábitats en los que se encuentra. Se ha aislado de muestras de suelo recogidas en todas las partes del mundo y en una amplia gama de ecosistemas (Ohba y Aizawa, 1978; Martin y Travers, 1989; Vásquez *et al.*, 1995; Dai *et al.*, 1996; Ibarra *et al.*, 2003; Iriarte *et al.*, 2000).

En general, a *B. thuringiensis* se le considera un microorganismo ligado al suelo ya que éste era el medio más frecuente a partir del cual se aisló en los primeros estudios. Sin embargo, los numerosos programas de búsqueda de cepas emprendidos desde entonces han logrado aislar cepas con actividad insecticida de casi cualquier hábitat. Uno de estos hábitats es el filoplano, motivo por el que se ha sugerido que *B. thuringiensis* es una bacteria epifita que vive en simbiosis con las plantas (Smith y Couche, 1991). Otros muchos sustratos son también ricos en aislados de *B. thuringiensis*, como el polvo de productos almacenados (Meadows *et al.*, 1992; Bernhard *et al.*, 1997), ambientes acuáticos (Goldberg y Margalit, 1997; Ichimatsu *et al.*, 2000; Iriarte *et al.*, 2000), insectos (Heimpel 1967; Kaelin *et al.*, 1994; Aldebis *et al.*, 1994) y distintos sustratos asociados a algunos agroecosistemas concretos (Kaelin *et al.*, 1994; Bel *et al.*, 1997).

A pesar de todo lo dicho, no se conoce aún cuál es el papel que desempeña la bacteria en todo este tipo de ambientes, ya que no necesita obligatoriamente la interacción con los

insectos para sobrevivir. Esto se constata por su carácter ubicuo y su presencia en lugares con muy poca población de insectos, como algunos suelos. Así, aunque el hábitat normal de *B. thuringiensis* sea el suelo, no presenta actividad insecticida para la mayoría de los insectos que habitan este medio, y sí es tóxica para larvas de insectos que viven sobre la parte epigea de las plantas o en el agua (como larvas de lepidópteros y de mosquitos) en donde la bacteria, aunque también presente, es mucho menos abundante y tiene menos oportunidades de interactuar con el insecto. Esta situación plantea la duda de si la bacteria sintetiza el cristal para los insectos con los que entra en contacto muy raramente o si lo produce con una finalidad distinta a la de matar a los insectos (Martin y Travers, 1989). Además, los aislados obtenidos en insectos enfermos o muertos tampoco muestran una actividad uniforme y existen cepas que resultan inactivas para la especie de la que han sido aisladas o que infectan a otros grupos (Chilcott y Wigley, 1993; Kaelin *et al.*, 1994), lo que se podría explicar por un comportamiento oportunista de la bacteria

2.2.3. Situación taxonómica y clasificación

La bacteria *B. thuringiensis* pertenece a la familia Bacillaceae y está filogenéticamente muy relacionada con otras especies del género *Bacillus*, concretamente las conocidas como el “grupo de *B. cereus*”, que incluye *B. cereus* (Frankland & Frankland), *B. anthracis* (Cohn) y *B. mycoides* (Flügge), así como también a los más recientemente descritos *B. pseudomycooides* (Nakamura, 1998) y *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998). Tal es el parecido con las dos primeras especies que la designación de *B. thuringiensis* como especie ha estado sometida a discusión (Schenepf *et al.*, 1998) y, debido a que no existen suficientes diferencias en sus características morfológicas y bioquímicas, se ha llegado a proponer su integración en una sola especie (Helgason *et al.*, 2000). A pesar de esto, el Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology reconoce la individualidad de estas especies basándose sobre todo en dos características diferenciales: la presencia de la inclusión o cristal parasporal y sus propiedades insecticidas (Sneath, 1986).

En general, se admite que *B. thuringiensis* es un *B. cereus* con la habilidad específica de producir inclusiones parasporales de naturaleza proteica (δ -endotoxinas) capaces de matar larvas de insectos (Sneath, 1986). Se sabe que los genes que codifican las δ -endotoxinas se localizan en plásmidos y que la transferencia de éstos desde *B. thuringiensis* hacia *B. cereus* resulta en la producción de inclusiones cristalinas en los aislados de *B. cereus* receptores, haciéndolos indistinguibles de *B. thuringiensis*. De igual manera, se ha observado que *B.*

thuringiensis puede perder la capacidad de producir δ -endotoxinas, probablemente debido a la pérdida del plásmido o a cambios en la expresión génica, haciendo la bacteria indistinguible de *B. cereus* (Meadows, 1993). A pesar de esta evidencia, se han mantenido como especies separadas por motivos prácticos, debido fundamentalmente al gran interés de *B. thuringiensis* en el control de plagas (Iriarte y Caballero, 2001). Cabe mencionar que esta característica de *B. thuringiensis* se está aprovechando para diseñar nuevas cepas que produzcan mezclas específicas de toxinas, con objeto de reducir el peligro de la aparición de resistencia en las poblaciones de los insectos plaga (Lenin *et al.*, 2001).

A partir de los métodos basados en características morfológicas y bioquímicas para la clasificación de cepas de *B. thuringiensis*, propuestos por Heimpel (Heimpel y Angus, 1958), se han ido ampliando los criterios y la metodología, incluyendo la producción de antibióticos, el patrón de esterasas, la susceptibilidad a distintos bacteriófagos, la serología del cristal o el perfil plasmídico.

El método más empleado para la clasificación de aislados de *B. thuringiensis* es el de la identificación serológica del antígeno flagelar o antígeno H, desarrollado en los años 60 en el Instituto Pasteur (Barjac y Bonnefoi, 1968). Se han identificado 84 variantes serológicas o serovares que han sido agrupados en subespecies (Sauka y Benintende, 2008). Aunque éste es un método sólido y fácil de aplicar, tiene sus limitaciones ya que clasifica las cepas en base a un parámetro muy concreto, que es la composición proteica de sus flagelos, y por lo tanto no incide en otros factores que determinan la variabilidad de la especie. Además, existen ciertas cepas para las cuales no se puede determinar el serotipo-H, puesto que la reacción de aglutinación a veces no es concluyente, bien porque no poseen flagelos o porque son autoaglutinantes (Jensen *et al.*, 1995).

Como complemento a esta técnica, hay un amplio abanico de métodos y técnicas que se han ido adoptando para la caracterización de cepas de *B. thuringiensis*: la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Carozzi *et al.*, 1991), la determinación del perfil de expresión proteica por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Chilcott y Wigley, 1993) o en gel de campos pulsantes (PFGE) (Gaviria Rivera y Priest, 2003), la hibridación ADN-ADN (Hansen *et al.*, 1998), el análisis del perfil plasmídico (Cinar *et al.*, 2008), la utilización de marcadores moleculares como RFLPs (Kuo y Chak, 1996) y RAPDs (Hansen *et al.*, 1998), o la determinación de la huella genética por Rep-PCR (Zara *et al.*, 2006).

2.2.4. Biología

Las esporas de *B. thuringiensis* pueden persistir bajo condiciones adversas por largos periodos de tiempo, pero cuando las condiciones ambientales y nutricionales son favorables se rompe la dormancia y las esporas germinan iniciando así el ciclo biológico de la bacteria (Figura 4). Generalmente esto ocurre en el hemocele del insecto infectado y con menor probabilidad en otro tipo de sustratos como en el suelo. La germinación de la espora se produce en sólo unos minutos y, aunque no se conocen bien todos los requerimientos, el factor primordial para que esto ocurra en el intestino de los insectos es el pH alcalino (Wilson y Benoit, 1993). La célula vegetativa crece y se multiplica activamente en condiciones aerobias, aunque es anaerobia facultativa. Las condiciones óptimas de crecimiento se sitúan entre 26-30°C y pH 6,5-7,5 (Bernhard y Utz, 1993). La bacteria se desarrolla adecuadamente en la hemolinfa de insectos (Fast, 1981) y en gran variedad de medios no selectivos (Sneath, 1986; Sambrook *et al.*, 1989).

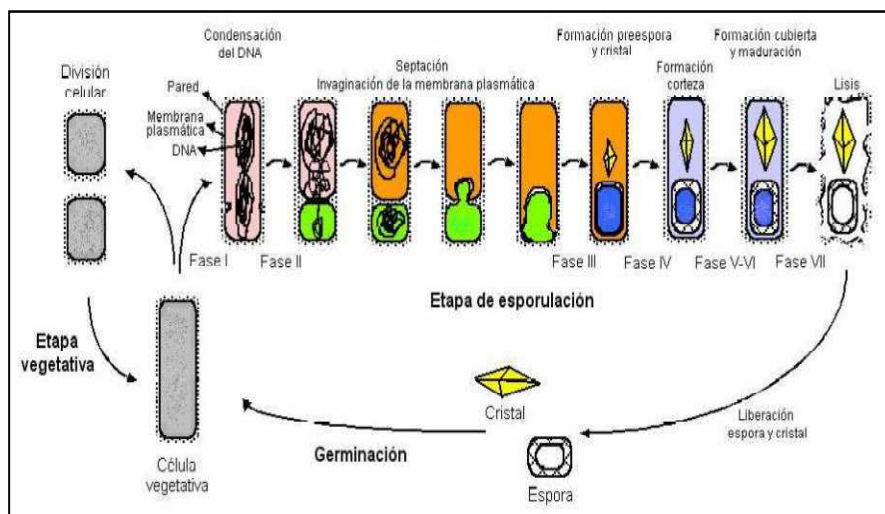


Figura 4. Ciclo de vida general de *Bacillus thuringiensis*. (Tomado de Alejandro Mentaberry, 2011)

La fase vegetativa de crecimiento finaliza con el agotamiento de nutrientes en el medio y comienza la fase estacionaria en la que se forma la endospora y la síntesis de uno o varios cristales parasporales, características de la especie (Figura 5); en esta fase la célula es denominada esporangio y está compuesta de dos compartimentos: la célula madre y la forespora (Agaisse y Lereclus, 1995), que durante el proceso de maduración se recubre de dos capas, el córtex al interior y la cubierta al exterior (Ball *et al.*, 2008). La esporulación y la

formación del cristal son favorecidas por la presencia de sales de calcio, magnesio, manganeso, hierro y zinc (Stewart *et al.*, 1981).

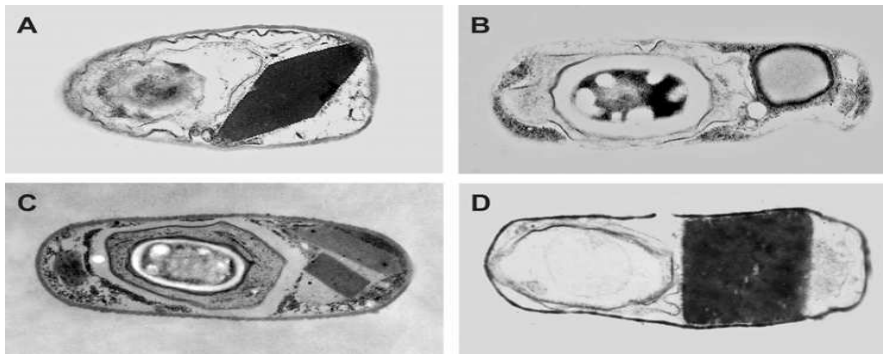


Figura 5. Micrografías electrónicas de *B. thuringiensis* subsp. *sotto* (Wasano *et al.*, 2000) (A), subsp. *sumiyoshiensis* (Wasano *et al.*, 2000) (B), subsp. *morrisoni* (Baum y Malvar, 1995) (C) y una cepa de serotipo no identificado (de Maagd *et al.*, 2001) (D). En todas estas imágenes la endoespora está situada al lado izquierdo del esporangio y el cristal parasporal al derecho. (Tomado de Vidal Quist, 2010)

Una vez completada la esporulación, se produce la lisis de la pared del esporangio liberándose el cristal y la espora en el medio y comenzando así un nuevo ciclo si las condiciones son favorables. Las esporas son muy resistentes a condiciones ambientales extremas, pueden sobrevivir en un estado metabólicamente inactivo durante largos periodos de tiempo hasta encontrar las condiciones adecuadas para la germinación. Sin embargo, son muy sensibles a la luz ultravioleta, pudiendo perder la viabilidad en poco tiempo (Joung y Côté, 2000; Krieg, 1975).

El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora. Existen algunos casos donde se han descrito cristales dentro del exosporio (Chilcott *et al.*, 1981; Mcpherson *et al.*, 1988), por lo que éstos continúan junto a las esporas tras la lisis (Huber y Lüthy, 1981; López-Meza y Ibarra, 1996). En otro caso muy atípico se pudo observar que el cristal se forma fuera del exosporio, pero ambos permanecen indefinidamente dentro del esporangio que no se lisa, preservándolos de una rápida degradación.

La morfología que adquieren los cristales puede ser muy diversa y normalmente está relacionada con el tipo de δ -endotoxinas que los componen. Así, los cristales de Cry1 son bipiramidales, de Cry2 cúbicos, de Cry3A prismático-rectangulares y de Cry4 esféricos u ovoides. También existen cristales poliédricos irregulares. Otro rasgo morfológico asociado a los cristales parasporales es la existencia de una membrana que envuelve a la inclusión a modo de funda; su presencia o ausencia y su grosor depende de la cepa (Wasano *et al.*, 2000).

Cada cuerpo de inclusión cristalino está constituido por proteínas Cry (δ -endotoxinas), de una o varias clases, que se agrupan entre sí mediante puentes de disulfuro (Lecadet y Lereclus, 1984). La estabilidad de estas uniones condiciona el pH de solubilización del cristal. Se estima que estos cristales pueden representar hasta un 30% del peso seco del esporangio (Bulla *et al.*, 1980) y que en laboratorio se puede obtener un rendimiento de 0.5 mg/ml de cultivo (Agaisse y Lereclus, 1995). Esta característica depende en gran medida de la facilidad de estas proteínas para formar inclusiones cristalinas. En estado insoluble, las proteínas son menos sensibles a la degradación proteolítica y pueden así acumularse en la célula madre (Baum y Malvar, 1995). El cristal, al igual que la espora e incluso de forma más acentuada, es sensible a los rayos ultravioletas.

2.2.5. Las toxinas

B. thuringiensis produce diferentes tipos de toxinas, algunas de las cuales muestran actividad exclusivamente contra invertebrados, como las δ -endotoxinas, mientras que otras son menos selectivas y pueden representar cierto riesgo para la salud humana. Todos estos factores de virulencia que produce la bacteria le permitirían sobrevivir y multiplicarse dentro del huésped, evadir su sistema inmune y producir septicemia. La presencia de estos factores depende de la cepa y debe ser tomados en consideración en la producción de cualquier insecticida basado en esta bacteria.

Entre estos factores se encuentran las β -exotoxinas, también llamadas thuringiensinas, metabolitos secundarios solubles en agua, termoestables y con acción insecticida que funcionan como análogos del ATP (Bravo, 2005). Debido a la toxicidad que presenta para vertebrados, es un requisito indispensable que las preparaciones comerciales de *B. thuringiensis* no contengan estas toxinas. Otras sustancias como hemolisinas, fosfolipasas, enterotoxinas y exoenzimas (quitinasas, proteasas) son también factores de virulencia sin especificidad por el orden de insectos que afectan y que se encuentran ampliamente distribuidos dentro de los distintos serovares de *B. thuringiensis* y otros miembros del grupo *B. cereus* (Guttman y Ellar, 2000). También se ha encontrado las llamadas proteínas insecticidas vegetativas (VIP), que son sintetizadas y secretadas al medio principalmente durante la fase de crecimiento vegetativo (Estruch *et al.*, 1996). Se han detectado 3 grupos (Vip1, Vip2 y Vip3) que muestran actividad sobre algunos lepidópteros y coleópteros (Maagd *et al.*, 2003).

2.2.6. Las δ -endotoxinas (proteínas Cry)

Las δ -endotoxinas son producidas durante la esporulación en forma de cristales parasporales y constituyen los principales factores insecticidas de *B. thuringiensis*.

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína parasporal de *B. thuringiensis* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos, o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry. Las proteínas Cyt se definen como proteínas paraesporales de *B. thuringiensis* que muestran actividad citolítica o tienen similitud con la secuencia de aminoácidos de toxinas Cyt; son exclusivas de algunas cepas de *B. thuringiensis*, sobre todo de subespecies que son activas contra dípteros (Promdonkoy *et al.*, 2008).

La primera clasificación de las δ -endotoxinas Cry se basó en su actividad insecticida (Hofte y Whiteley, 1989); así Cry I eran efectivas contra Lepidópteros, Cry II contra Lepidópteros y Dípteros y más pequeñas de 70 kDa, Cry III contra Coleópteros, Cry IV contra Dípteros y CryV y CryVI contra nemátodos (Bravo *et al.*, 2005).

Sin embargo, este sistema pronto quedó obsoleto, ya que la clasificación basada en el espectro insecticida resultaba en muchos casos inconsistente. En primer lugar, existen muchas δ -endotoxinas para las cuales no se conoce su actividad insecticida (van Frankenhuyzen, 2009); en segundo lugar, se ha observado que el espectro de acción de muchas δ -endotoxinas es más amplio que el que proponía esta primera clasificación (Souza *et al.*, 2009; Sayyed *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2007; Méndez-López *et al.*, 2003; Federici y Bauer, 1998). Esta circunstancia, sumada al descubrimiento de nuevas δ -endotoxinas con espectros de toxicidad diferentes, provocó que se propusiera una revisión de la nomenclatura.

Esta nueva nomenclatura, desarrollada a finales de la década de los 90, se basa exclusivamente en las relaciones entre las secuencias de aminoácidos de las toxinas (Crickmore *et al.*, 1998). Se establecen cuatro niveles de homología basados en el grado de divergencia de su secuencia; para el primer y cuarto nivel se utiliza un número y para el segundo y tercer nivel se usa una letra (mayúscula y minúscula, respectivamente). Así, el primer nivel de homología implica una identidad de al menos 45% de la secuencia de aminoácidos. Las toxinas que comparten además la primera letra tendrán un nivel de homología de entre el 45% y el 78%, y las que tengan también en común la letra minúscula tendrán entre el 78% y el 95% de homología. El cuarto nivel implica, por tanto, una identidad superior al 95%. El grado de homología entre dos δ -endotoxinas se determina a través de los programas informáticos ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) y Phylip (Felsenstein, 1989).

Según este criterio, el sistema permite la inclusión de nuevas δ -endotoxinas así como de proteínas cristalinas de alta homología producidas por especies diferentes a *B. thuringiensis*, como son: Cry16 y Cry17, producidas por *Clostridium bifermentans* (Weinberg y Séguin) (Barloy *et al.*, 1998) y Cry18, por *Bacillus popilliae* (Dutki) (Zhang *et al.*, 1997).

Las δ -endotoxinas son proteínas globulares con una estructura terciaria compuesta por tres dominios: el dominio I está constituido por siete α hélices, mientras que los dominios II y III están formados por hojas β repetidas (Bravo, 1997). En cuanto a la función, se piensa que el dominio I está implicado en la inserción en la membrana de las células epiteliales y la formación del poro, mientras que los dominios II y III se consideran responsables de la unión específica con el receptor de la membrana

2.2.7. Mecanismo de acción de las proteínas Cry

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se ha descrito, principalmente en lepidópteros, como un proceso de múltiples etapas (Figuras 6, 7 y 8).

Es necesario que los insectos ingieran los cristales proteicos junto con el alimento. Los cristales se disuelven en el ambiente reductor y alcalino de los jugos intestinales; hay indicios de que la velocidad de disolución del cristal depende del pH del jugo intestinal del insecto. Los polipéptidos liberados de los cristales son protoxinas carentes aún de actividad biológica y cuyo peso molecular difiere de un tipo de polipéptido a otro. Las protoxinas que van a ser tóxicas para larvas de lepidópteros están en el rango de los 130 kDa, mientras que las tóxicas contra coleópteros y dípteros en torno a 67 kDa (Gill *et al.*, 1992).

El siguiente y más decisivo paso es la activación proteolítica de la protoxina (Ogiwara *et al.*, 1992; Inagaki *et al.*, 1992; Bravo *et al.*, 2004). En el caso de las protoxinas activas contra lepidópteros la activación requiere la acción de las serina proteasas del insecto, cuya función principal es la digestión del alimento en el mesenterón de las larvas. Las serina proteasas cortan la protoxina por el extremo C-terminal para dar un polipéptido bien definido de aproximadamente la mitad del tamaño original. Veintiocho aminoácidos se retiran también del extremo N-terminal. El polipéptido resultante presenta gran actividad frente a posteriores degradaciones proteolíticas, que implicarían una disminución de la actividad insecticida.

Tras la activación proteolítica en el lumen del mesenterón, las toxinas, bajo su forma monomérica, atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente y a la cadherina (glucoproteína de membrana) con afinidad en la cara externa de la membrana de las células columnares (Bravo *et al.*, 2004; Griko *et al.*, 2007). Después se inicia una cascada

de señalización dependiente del ión magnesio que sería responsable de la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006). Además, el inicio de la cascada de señalización estimula la exocitosis de la cadherina, desde vesículas intracelulares hacia la cara externa de la membrana celular, aumentando el número de receptores y, por ende, reclutando un número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial (Zhang *et al.*, 2008). Por otro lado, con base en experimentos *in vitro* y bioensayos, se propone que la unión de los monómeros a la cadherina facilita la escisión proteolítica sobre el extremo N-terminal de la toxina (Gómez *et al.*, 2002). La última escisión induce la unión de los monómeros y se establece una forma oligomérica pre-poro, cuya estructura incrementa la afinidad por un receptor secundario, como puede ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina (Bravo *et al.*, 2004; Jurat-Fuentes y Adang, 2004). Por último, la unión a ese segundo receptor facilita la formación de un poro en el epitelio del mesenterón provocando un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular (Bravo *et al.*, 2004). El tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y lleva a la muerte del insecto.

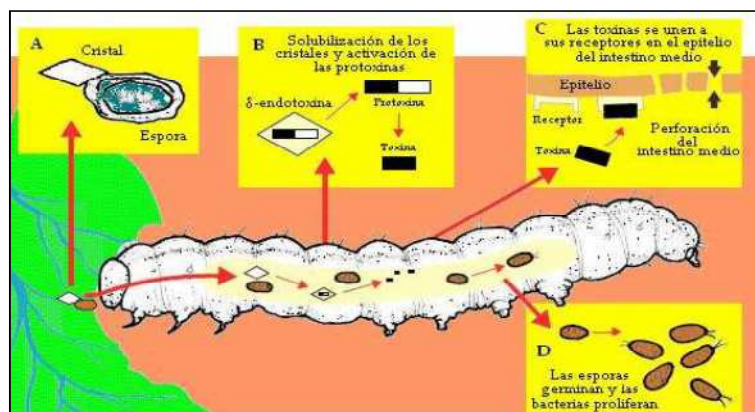


Figura 6. Etapas del modo de acción de *B. thuringiensis* en el tracto gastrointestinal de la larva de un insecto (Tomado de Alejandro Mentaberry, 2011; Fue adquirido por Gentileza del Dr. D. H. Sauka).

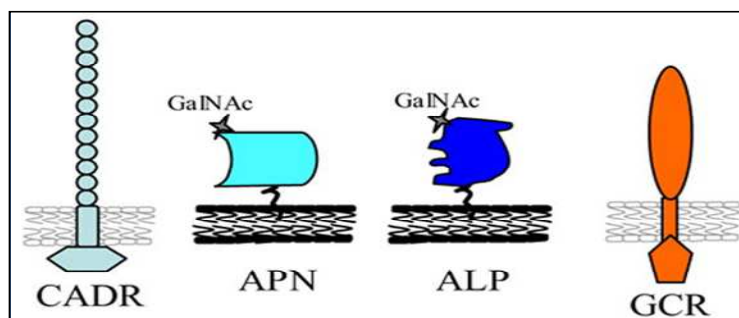


Figura 7. Moléculas receptoras de proteínas Cry1A. CADR, receptor de cadherina; APN, N-aminopeptidasa, ALP, fosfatasa alcalina, GCR, receptor glico-conjugado 270 kDa. Fuente: Bravo *et al.* 2007.

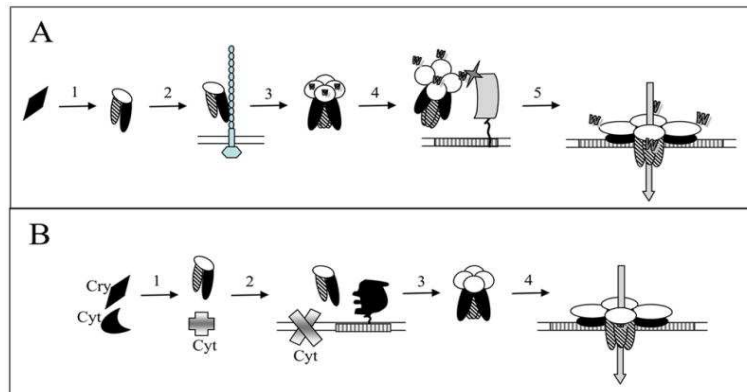


Figura 8. Modelo de de acción de las toxinas Cry y Cyt de Bt. Cuadro A. Interacción de la toxinas Cry con diferentes moléculas receptoras en lepidópteros: (1) solubilización y activación de la toxina; (2) unión de monómeros Cry al primer receptor (CADR o GCR); (3) formación del oligómero; (4) unión de la toxina oligomérica al segundo receptor (IPM-APN o GPI-ALP) (5) inserción de la toxina oligomérica en lípidos y formación de poros. Cuadro B. Modo de acción de las toxinas Cry y Cyt en larvas de dípteros.:(1) solubilización y activación las toxinas Cry y Cyt; (2) Cyt se inserta en la membrana y la toxina Cry se une a receptores situados en la membrana (ALP o toxina Cyt); (3) oligomerización de la toxina. Fuente: Bravo *et al.*, 2007.

La reacción inicial a una intoxicación causada por la ingestión de cristales es el cese de la alimentación. Si la cantidad de cristales ingeridos es alta, a la parada en la alimentación sigue la excreción del contenido intestinal y la parálisis general. Aunque los insectos paralizados pueden mantenerse vivos durante varios días tras la ingestión de una dosis letal de *B. thuringiensis*, los insectos pierden peso y comienzan a encogerse a causa de la deshidratación debida a la pérdida de fluidos. Curiosamente, la infección bacteriana de la hemolinfa con frecuencia no empieza hasta después de la muerte de la larva. Esto indica que el epitelio intestinal, aunque dañado, continúa actuando como una barrera contra la infección bacteriana (English y Slatin, 1992).

Si la dosis de cristales ingeridos es subletal, la larva del insecto podría ser capaz de recuperarse. El epitelio intestinal tiene un considerable potencial de regeneración debido a que la tasa de reposición natural de las células epiteliales es alta. La ingestión de estas dosis subletales en condiciones de campo puede deberse a una actividad alimenticia restringida, por ejemplo debida a periodos de tiempo frío. Esto es una desventaja clara de las preparaciones de *B. thuringiensis* cuya actividad en el control de plagas está muy relacionada con el comportamiento alimenticio del insecto diana.

2.2.8. Los genes que codifican las proteínas Cry

El genoma de *B. thuringiensis* tiene un tamaño que oscila de 2,4 a 5,7 millones de pares de bases (Mpb) (Carlson y Kolsto, 1994). Además del cromosoma, el material genético contiene elementos extracromosómicos, denominados plásmidos. Éstos pueden estar en un número variable de 1 a 17 (Baum y Gonzales, 1992) cuyo tamaño varía de 2 a más de 200 miles de pares de bases (kb) (1,5 a 150 mDa) (Jarret, 1983). Los genes que codifican las proteínas Cry (genes *cry*) se encuentran en plásmidos de gran tamaño (>40 kb) (Bravo y Cerón 2004), aunque se ha detectado un gen *cry* en un plásmido de bajo peso molecular que se replica mediante el mecanismo del círculo rodante (Loeza-Lara *et al.*, 2005). Es frecuente encontrar dos o más genes *cry* en el mismo plásmido (Ben-Dov *et al.*, 1999; Berry *et al.*, 2002) y el mismo gen se puede hallar en dos o más plásmidos distintos (Kronstad *et al.*, 1983). Con menos frecuencia los genes *cry* pueden localizarse en el cromosoma bacteriano (Aronson *et al.*, 1983; Lreclus *et al.*, 1989).

Las cepas de *B. thuringiensis* pueden portar un único gen *cry*, como por ejemplo *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73, que posee solamente el gen *cry1Ac* (González *et al.*, 1981), o bien presentar perfiles génicos muy complejos, con hasta ocho genes *cry* diferentes (Salehi Jouzani *et al.*, 2008; Armengol *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 1998; Ben-Dov *et al.*, 1997; Uribe *et al.*, 2003).

En 1981 se clonó el primer gen que codifica para una proteína cristalina (Schnepp y Whiteley, 1981). Desde entonces, se han caracterizado muchos otros genes *cry*, así como genes de proteínas Cyt. En la actualidad se conocen 617 genes de proteínas Cry distribuidos en 235 holotipos y 70 familias; y 34 genes de proteínas Cyt, con 11 holotipos y 3 familias (Crickmore, 2012).

Los plásmidos de *B. thuringiensis* son conjugativos, no solo intraespecie sino también ínterespecie. Éstos se replican y mantienen a lo largo de generaciones con una gran eficacia lo que sugiere que estos replicones pueden presentar una ventaja evolutiva y que por consiguiente justifican su papel dentro del mecanismo de replicación de la bacteria (Bravo y Cerón, 2004).

En general, es posible correlacionar el tipo de gen *cry* presente en una determinada cepa o aislamiento con su actividad insecticida. Por lo tanto, la identificación del contenido génico *cry* de una cepa de *B. thuringiensis* puede utilizarse para efectuar dicha predicción (Porcar y Juárez, 2003).

2.2.9. Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* como insecticida

La rica diversidad en el genoma de *B. thuringiensis* además de permitir al microorganismo subsistir en los ambientes que habita, hace posible el desarrollo de cepas con gran potencial insecticida, con nuevas actividades biológicas y más seguras para su uso comercial, así como la producción de organismos genéticamente modificados.

Los bioinsecticidas desarrollados desde los inicios y muchos otros usados en la actualidad incluyen en su formulación como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de aislados naturales de *B. thuringiensis*. Estos productos tienen como limitación que presentan una especificidad restringida a ciertos órdenes de insectos, baja toxicidad y poca persistencia. A pesar de ello, han sido los agentes de control biológico más populares (Brar *et al.*, 2006).

B. thuringiensis var. *kurstaki* HD-1 aislada originalmente por Dulmage en 1970, es por excelencia la cepa utilizada para el control de lepidópteros, plagas agrícolas y forestales. Es una de las cepas mejor estudiadas y se caracteriza por la portación de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia*, con toxicidad para lepidópteros (Höfte y Whiteley, 1989; Sauka, 2007). El descubrimiento de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Goldberg y Margalit, 1977), para el control de larvas de mosquitos y jejenes, expandió el uso de *B. thuringiensis* como bioinsecticida.

Los productos conocidos como bioinsecticidas de primera generación, cuya formulación incluye como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de *B. thuringiensis*, constituyen la mayor proporción de los productos comerciales que se utilizan en el mundo. Estas formulaciones satisfacen los requerimientos de distintos ámbitos, desde la agricultura hasta la salud pública (Maxwell *et al.*, 2006; Mahilum *et al.*, 2005). Sin embargo, el conocimiento de las bases genéticas de la toxicidad de *B. thuringiensis* así como de diferentes técnicas de transformación genética están permitiendo el desarrollo de los denominados productos-Bt de segunda y tercera generación. Estos productos, en lugar de basarse en esporas y cristales de cepas naturales, se obtienen a partir de cepas de *B. thuringiensis*, u otras especies de bacterias que son modificadas genéticamente.

Los bioinsecticidas de segunda generación son una mezcla de esporas y cristales que se obtienen mediante la introducción de genes *cry* de una cepa de *B. thuringiensis* con características deseadas en otra cepa receptora que no las tiene, utilizando para ello algún mecanismo de transferencia de genes, ya sea transformación, transducción y/o conjugación, lo que permite ampliar su espectro de actividad hacia otros insectos plaga o aumentar su

toxicidad. Las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas como huésped de otros genes distintos de los que poseía la cepa original, se mantienen de manera estable y expresan eficientemente varios genes *cry* permitiendo aumentar la toxicidad para un insecto determinado en forma aditiva o sinérgica. Además, distintos genes *cry* con diferentes modos de acción o diferentes propiedades de unión al receptor pueden reducir la posibilidad de desarrollo de resistencia (Tabashnik, 1994).

Productos transconjugantes a base de cepas de *B. thuringiensis* se han obtenido transfiriendo por conjugación un plásmido que porta un gen *cry1A* de una cepa de la var. *aizawai* a una cepa receptora de la var. *kurstaki* (Condor®), o bien un plásmido que contiene un gen *cry1* de una cepa de la var. *kurstaki* a una cepa receptora de la var. *aizawai* (Cutglass). El producto Foil®, que produce las proteínas Cry1Ac y Cry3A, se obtiene por transferencia de un plásmido portador del gen *cry3A* de *B. thuringiensis* var. *morrisoni* a una cepa de la var. *kurstaki*, con lo que se logró ampliar su espectro de huéspedes para plagas de lepidópteros y coleópteros (Gawron y Baum, 1991). Otro de los logros desarrollados con objeto de obtener este tipo de productos, que no han sido registrados, es conseguir la ampliación de la actividad tóxica a especies del género *Spodoptera*, de la cepa HD-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (que sólo contiene *cry1Ac*) al introducirle el gen *cry1C* de *B. thuringiensis* var. *aizawai* (gen con actividad tóxica para *Spodoptera* (Kalman *et al.*, 1995).

Los productos de tercera generación se están desarrollando con el propósito de resolver la limitación de la baja persistencia, o simplemente para aumentar la toxicidad en insectos. Estos productos se obtienen mediante una estrategia que emplea bacterias recombinantes que han sido modificadas genéticamente con genes *cry*, o bien cepas de *B. thuringiensis* modificadas con otros genes que codifican otros factores de virulencia distintos de las δ -endotoxinas (Gaertner, 1993). Un ejemplo destacado es la encapsulación de varias proteínas Cry dentro de *Pseudomonas fluorescens*. La bacteria se mata cuando el cultivo ha expresado la proteína quedando éstas microencapsulada. Esta forma brinda una protección a las proteínas Cry de la degradación causada por el medio ambiente y otorga una actividad insecticida residual más prolongada (Tamez- Guerra *et al.*, 2000).

Otra estrategia para la obtención de productos de tercera generación es la inserción de los genes *cry* de *B. thuringiensis* en otros microorganismos que tengan la capacidad de colonizar el hábitat del insecto plaga (Gelernter, 1990). Se han insertado genes específicos con toxicidad para lepidópteros en bacterias que colonizan la superficie externa de hojas y raíces de plantas, tales como *Pseudomonas cepacia* (Stock, 1990), *Pseudomonas fluorescens* (Obukowicz *et al.*, 1986; Waalwijk *et al.*, 1991) y *Bacillus megaterium* (Bora, 1994), o

internamente, tales como *Clavibacter xyly* (Lampel *et al.*, 1994) para combatir insectos que se alimentan en el interior de la planta (endófitos). La introducción de genes *cry* en otras bacterias distintas de *B. thuringiensis* tiene el inconveniente de liberar microorganismos recombinantes actualmente con muchas restricciones de uso.

Uno de los problemas planteados con este tipo de microorganismos se relaciona con la posible inestabilidad de la característica insecticida que se introduce (Tiedje *et al.*, 1989). Se han utilizado distintas estrategias para minimizar este problema, como por ejemplo el uso de derivados del transposón Tn5 transposasa negativos (Obukowicz *et al.*, 1986) o “vectores suicidas”, cuya integración es dependiente de la recombinación entre secuencias de ADN homólogas (Waalwijk *et al.*, 1991). Otra posible solución a esta inestabilidad puede ser el uso de cepas del género *Bacillus* como receptoras de genes *cry*, dada su afinidad taxonómica con *B. thuringiensis*. Bora *et al.* (1994) introdujeron el gen *cry* de la subsp. *kurstaki* HD-1 en la cepa RS1 de *B. megaterium* que coloniza de forma natural la filosfera de las plantas de algodón. El organismo transformado persistió más tiempo ofreciendo una mejor protección de las plantas a *Helicoverpa armigera*. También cepas transformadas de *B. subtilis* y *B. licheniforme* que expresan Cry1A y habitan de forma natural en el filoplano de las hojas del tomate sobrevivieron más de 45 días en la superficie de las plantas (Theodulos *et al.*, 2003).

Una cepa bacteriana (NMO10) aislada de la rizosfera del algodón, a la que se introdujo el gen *cry1C* de *B. thuringiensis* var. *entomocidus*, resultó más tóxica contra larvas neonatas de *S. littoralis* comparada con un producto comercial (Ibrahim y Omar, 2009).

Las técnicas de inserción de genes han permitido también la construcción de cepas de *B. thuringiensis* recombinantes con genes que codifican para otros factores de virulencia distintos de las δ -endotoxinas. Así se logró la expresión del gen cromosómico de la quitinasa durante la etapa de esporulación de una cepa recombinante de *B. thuringiensis* var. *aizawai* que demostró una toxicidad mejorada para *Spodoptera exigua* con respecto a la cepa natural (Thamthiankul *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006), o la obtención de una cepa recombinante que expresa de manera estable el gen *vip3Aa7*, a partir de una cepa comercial de *B. thuringiensis* muy tóxica para *H. armigera* y *Plutella xylostella*. De esta forma se logró aumentar la toxicidad para los insectos mencionados y, además, ampliar su rango de toxicidad a *S. exigua*.

Por otro lado, se han desarrollado métodos que permiten incorporar las toxinas de *B. thuringiensis* a las plantas, para ello se utilizaron dos formas: 1) inoculando organismos colonizadores que expresen las toxinas, tal como se explicó anteriormente; 2) mediante la manipulación de genotipo de las plantas para que expresen la toxina en sus propios tejidos.

En las últimas décadas, los avances realizados en la tecnología de transformación de plantas han permitido introducir y expresar de forma estable genes *cry* en numerosas plantas conocidas actualmente como plantas Bt, entre las cuales figuran algunos cultivos de importancia mundial tanto herbáceos como leñosos. Los cultivos donde más éxito ha tenido esta estrategia, se encuentran arroz, algodón, maíz que fueron transformadas con el gen *cry1*, y patata que modificada con *cry3A* (Sanchis y Bourguet, 2008). Las ventajas del empleo de este tipo de plantas son: reducir aplicaciones externas de insecticidas, disminuir los costes de producción y los riesgos para el medio ambiente y la salud de las personas, proporcionar una protección duradera a lo largo de la temporada de cultivo y, por último, afectar solo a insectos que se encuentran alimentándose de los cultivos (Betz *et al.*, 2000).

A pesar de todo, existen inconvenientes que amenazan el desarrollo futuro de la utilización de plantas Bt. Uno de los más importantes es la generación de resistencia en las poblaciones naturales de insectos que se alimentan de ellas, debido a la gran presión de selección que provoca el uso de estos cultivares genéticamente modificados (Van Rie y Ferré, 2000). Este fenómeno determinaría la inutilización de determinadas proteínas Cry para su control, ya sea mediante su empleo en plantas transgénicas o con bioinsecticidas que los contengan (González-Cabrera, 2001).

2.2.10. La resistencia a *B.thuringiensis*

La intensa presión de selección realizada sobre los insecticidas químicos ha provocado la aparición de multitudes de resistencia en campo a varias materias activas (Georghiou y Laguna Tejada, 1991). Se pensaba que era poco probable que un insecto lograra desarrollar algún tipo de tolerancia a los bioinsecticidas (MacGaughey, 1985); sin embargo, se ha demostrado en más de una ocasión, que este problema es extensivo a cualquier agente de control de insectos, incluyendo las proteínas Cry de *B. thuringiensis*, siempre que se haga un inadecuado uso del mismo (Tabashnik, 1994).

En la actualidad existen diferentes casos de resistencia a *B. thuringiensis*. La polilla de la col *Plutella xylostella* (L.) (Tabashnik *et al.*, 1990; Selton *et al.*, 1993) es la primera especie que ha desarrollado niveles de resistencia destacables en campo a formulados a base de *B. thuringiensis*, en particular Dipel® y Xantari® (Ferré y Van Rie, 2002). Varios autores han señalado situaciones similares de resistencia en poblaciones de laboratorio de *Plodia*

interpunctella (Hubner), *Heliothis virescens* (Fabricius), *Aedes aegypti* (L.) (Tabashnik *et al.*, 1994) y *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Rahardja y Whalon, 1995).

Así mismo, en poblaciones de insectos que habían sido reiteradamente expuestos a un tipo de toxinas Cry, se han encontrado resistencia no solo a éstas sino a otras toxinas Cry (Lee *et al.*, 1995; Ballester *et al.*, 1999). Este fenómeno, que se conoce como resistencia cruzada, constituye una importante limitación al manejo de las toxinas Cry para el control de plagas. Poblaciones larvarias de *P. xylostella*, expuestas durante sucesivas generaciones a Cry1A y Cry2, desarrollaron resistencia cruzada a Cry1F y Cry1J (Tabashnik *et al.*, 1994; Tabashnik *et al.*, 1997). Además, una población de *Heliothis virescens* (F.) seleccionada para resistencia a Cry1Ac mostró resistencia cruzada frente a Cr1Aa, CryAb, Cry1F y Cry1J (Gould *et al.*, 1995).

Los mecanismos de resistencia a las proteínas Cry pueden estar relacionados con alteraciones en cualquiera de los pasos en el modo de acción de las mismas. Hasta el momento se han identificado tres mecanismos. En algunos insectos una alteración en la actividad proteolítica del mesenterón se ha correlacionado con el desarrollo de resistencia (Oppert *et al.*, 1997). Un mecanismo que es responsable de la mayoría de los casos de resistencia, tanto en poblaciones de campo como en laboratorio, es la alteración del sitio de unión de la toxina Cry a la membrana de las células del mesenterón (Ferré y Van Rie, 2002). Un tercer posible mecanismo consiste en el incremento de la velocidad de reparación del tejido epitelial dañado como el observado en *H. virescens* (Martinez-Ramírez *et al.*, 1999). Los dos primeros mecanismos han sido los más estudiados hasta la fecha (Ferré y Van Rie, 2002; Griffiths y Aroian, 2005; Bravo *et al.*, 2005).

La utilización de plantas modificadas genéticamente, que expresan δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, se está extendiendo rápidamente y la tecnología de aplicación está siendo adoptada por un creciente número de países. La Unión Europea es todavía reticente a la adopción de esta tecnología por los posibles efectos secundarios que puede acarrear, entre ellos el favorecer el rápido desarrollo de poblaciones de insectos resistentes a las toxinas de *B. thuringiensis*, provocando la pérdida de eficacia de los productos insecticidas basados en esta bacteria, los cuales constituyen actualmente un recurso muy valioso en programas de control integrado de plagas y en la agricultura ecológica.

Las estrategias de manejo de resistencia aconsejadas para cultivos Bt se basan principalmente en la utilización de refugios, que consiste en mezclar cultivares transgénicos y no transgénicos, introduciendo un mínimo del 20% de plantas no transgénicas, de forma que

puedan sobrevivir insectos susceptibles que diluyan la aportación genética que los supervivientes resistentes realizan a la próxima generación (Gould, 1998). En esta estrategia es importante que las plantas transgénicas expresen niveles muy altos de toxina para asegurar la muerte de todos los individuos susceptibles. La segunda estrategia es el uso de plantas que expresen varios genes de proteínas insecticidas con distinto modo de acción, en lo que se refiere a la unión con el receptor de membrana.

En un principio se propusieron también otras estrategias que han acabado por modificarse o descartarse, como la utilización de plantas transgénicas ‘menos tóxicas’ de manera que, aunque no maten a todos los insectos, retarden su desarrollo lo bastante como para que éstos sean controlados por los enemigos naturales (Ferré *et al.*, 2001).

2.3. *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa*

El género *Paenibacillus* comprende más de 89 especies (Raza. *et al.*, 2008), originalmente incluidas en el género *Bacillus*, entre las que se encuentra *Paenibacillus polymyxa*, especie tipo de este género (Ash *et al.*, 1993; Truper, 2005). Es una bacteria anaerobia facultativa (Vasan *et al.*, 2001) formadora de endospora, Gram positiva (Zengguo *et al.*, 2007), no patógena y que se localiza en distintos ambientes como el suelo, rízofera de las plantas y sedimentos marinos (Timmusk *et al.*, 2005; Ravi *et al.*, 2007).

P. polymyxa produce metabolitos que tienen amplias aplicaciones en los ecosistemas agrícolas, la bioconservación de los alimentos, la industria de la medicina, la biofloculación en aguas residuales y el procesamiento de minerales (Kim *et al.*, 2010). Todo ello confiere este microorganismo un papel importante en el funcionamiento de los ecosistemas y un gran potencial en procesos industriales.

En los ecosistemas agrícolas, esta bacteria posee una amplia gama de capacidades, como: fijar el nitrógeno atmosférico y producir hormonas que promueven el crecimiento de las plantas, producir enzimas hidrolíticas y producir antibióticos contra microorganismos nocivos (Lal y Tabacchioni, 2009); además, la liberación de compuestos orgánicos puede ayudar a la absorción del fósforo por las plantas y aumentar la porosidad del suelo (Timmusk *et al.*, 1999). Así, por ejemplo, la inoculación de plantas del garbanzo con *P. polymyxa*, sola o en combinación con *Glomus intraradices* y *Pseudomonas putida*, además de incrementar los niveles de nitrógeno, fósforo y potasio aumentó significativamente la clorofila en las plantas inoculadas (Akhtar y Siddiqui, 2007).

Se han propuesto tres mecanismos mediante los cuales *P. polymyxa* produce beneficios a las plantas cultivadas:

El primer mecanismo es la producción de hormonas como las citoquininas, auxinas, etileno y giberelinas (Timmusk *et al.*, 1999), compuestos que aumentan la expansión de la raíz y crecimiento de las plantas. La inoculación de *P. polymyxa* en *Triticum*, *Lolium*, *Trifolium* y *Agropyron* ha resultado en diferentes efectos, desde el incremento de la relación tallo/raíz o aumento de la germinación (Chanway *et al.*, 1988), hasta un mayor rendimiento y peso seco de la planta sin afectar significativamente a su desarrollo. Chanway *et al.* (1988) han atribuido estos efectos a la producción de fitohormonas, como el ácido indolacético, más que a la fijación de Nitrógeno.

El segundo mecanismo es la producción de antibióticos y promoción de la inmunidad en la rizofera. Ciertas cepas de *P. polymyxa* que se asocian con muchas especies vegetales

han mostrado cierta eficacia en el control de hongos y bacterias patógenos de plantas. Heulin *et al.* (1994) observó que la actividad antagonista de *P. polymyxa* disminuye la capacidad infecciosa de dos hongos fitopatógenos (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y *Fusarium oxysporum*). También *P. polymyxa* ha mostrado una singular capacidad de proteger a las plántulas de tomate de la marchitez bacteriana (Li *et al.*, 2011), causada por *Ralstonia solanacearum*, una bacteria del suelo que invade la planta a través de las raíces y coloniza los haces vasculares (Chavez *et al.*, 2012) impidiendo el transporte de agua y nutrientes; *P. polymyxa* coloniza y forma una biopelícula alrededor de las raíces de la plántula de tomate, impidiendo así la entrada del patógeno.

El tercer mecanismo es la capacidad de la bacteria de fijación del nitrógeno atmosférico y producirlo en forma de NH_3 utilizable por las plantas (Heulin *et al.*, 1994).

P. polymyxa se ha aislado principalmente de la rizosfera de un amplio rango de cultivos, como trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum gramineas*) (Lindberg y Granhall, 1984), trébol blanco (*Trifolium repens*), raigrás perenne (*Lolium perenne*), agropiro crestado (*Agropyron cristatum*) (Holl *et al.*, 1988), el pino contorta (*Pinus contorta latifolia*) (Holl y Chanway, 1992), abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) (Shishido *et al.*, 1996), judías (*Phaseolus vulgaris*) (Petersen *et al.*, 1996) y ajo (*Allium sativum*) (Kajimura y Kaneda, 1996). También se encontraron cepas endofitas de esta bacteria en raíces de algunas plantas. Lin *et al.* (2010) estudiaron una bacteria endofita en el algodón (cepa Jaas cd) que mostró alta actividad contra 12 hongos patógenos, entre ellos *Verticillium dahliae*, *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *F. moniliforme* y *Rhizoctonia solani*, esta cepa fue identificada como *P. polymyxa*.

El desarrollo de las plantas transgénicas que expresan los genes cry de *B. thuringiensis* ha sido considerado como un enfoque adecuado para superar la inestabilidad de la proteína Cry en el medio ambiente. Sin embargo, la comercialización de este tipo de cultivos requiere un proceso muy largo de tiempo. Por lo tanto, la aplicación de toxina Cry en la superficie de las plantas mediante su expresión en microorganismos adecuados que habitan el filosfera, puede ser una opción viable para la liberación prolongada de las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*.

Una cepa de *P. polymyxa* (Pp113) genéticamente modificada, a la cual se le introdujo el gen cry1Ac de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, fue capaz de colonizar la filosfera en plantas de arroz y mejorar su rendimiento. Esta cepa transformada fue aplicada por espolvoreo sobre plantas de arroz y se encontró que la persistencia en la planta y su toxicidad contra larvas

recién nacidas del barrenador amarillo del tallo (*Scirpophaga incertulas*) era comparable a la cepa natural de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 (Sudha *et al.*, 1999).

Debido a sus efectos beneficiosos en las plantas y su persistencia en la filosfera, el uso de *P. polymyxa* como un bioinsecticida y como biofertilizante puede ser prometedor.

3. Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Spodoptera littoralis*

3.1.1. Procedencia

Con el fin de mantener una población de *S. littoralis* en insectario, que sirviera de base para disponer de las larvas necesarias en los bioensayos, se llevaron a cabo, durante octubre de 2007, prospecciones de campo en cultivos de alfalfa en las proximidades de Córdoba. Se aprovecharon los días nublados, ya que en estas condiciones las larvas de esta especie tienen más actividad sobre la planta y es más fácil realizar la recogida.

El método de muestreo consistió en la recogida manual de las larvas, que se disponían en cajas de cría con sustrato natural para inmediatamente. Una vez en el laboratorio, eran individualizadas en cajas de plástico transparente, de 38 mm de diámetro y 19 mm de altura, con apertura de malla metálica fina para facilitar la ventilación. Las larvas eran alimentadas con dieta artificial hasta la pupación. Con los adultos emergidos se estableció una población de cría en insectario que fue mantenida de forma continuada durante el desarrollo del presente trabajo.

3.1.2. Método de cría

La cría de *S. littoralis* se lleva a cabo en condiciones de insectario: 26 ± 2 °C, HR $65 \pm 5\%$ y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, siguiendo el método puesto a punto en el Laboratorio de Entomología Agroforestal de la Universidad de Córdoba.

Para la reproducción de la especie, 5 ó 6 parejas de adultos se confinan en ponaderos cilíndricos, de 12 cm de diámetro y 24 cm de altura, fabricados con papel de filtro. Durante el periodo de permanencia en el ponadero, los adultos son alimentados con disolución acuosa de miel al 10%, suministrada en un pequeño recipiente de plástico con algodón que se repone periódicamente. Cada día se recoge la puesta de los ponaderos. Los huevos se suelen encontrar en las paredes y tapas de los ponaderos, agrupados en una o dos capas formado lo que se conoce como plastones. Para su desinfección, los trozos de papel de filtro que contiene las plastones se sumergen durante 15 minutos en formalina (disolución acuosa de formaldehído al 10%), tras lo cual se enjuagan con agua desionizada para eliminar cualquier residuo de formalina y se dejan secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Una vez secos, los plastones se introducen en cajas de cría de plástico, de 27 x 17 x 8 cm. La tapa, que cierra herméticamente la caja, posee dos aberturas de 8 x 5 cm que están selladas con papel de filtro, de forma que se permite la ventilación y se controla el exceso de humedad en el interior, al mismo tiempo que se impide el escape de larvas neonatas. Debido al marcado geotropismo negativo que poseen las larvas recién nacidas, la caja se coloca inicialmente de forma invertida. Así, en la parte interna de la tapadera (que en principio quedará como base de la caja) se colocan los plastones y en el fondo de la caja se dispone la dieta adherida mediante presión. Varios días después de la eclosión de los huevos, se da la vuelta a la caja tomando ésta su posición normal. Cuando las larvas alcanzan el tercer estadio, se procede a disminuir la densidad larvaria, con el fin de evitar problemas de competencia intra específica y canibalismo.

Las larvas son mantenidas en las cajas de cría durante todo su desarrollo, alimentándolas con dieta artificial (Poitout y Bues, 1974) modificada por Santiago-Álvarez (1977). Para la preparación de la dieta se sigue el método descrito por Vargas-Osuna (1985). Los trozos de dieta se van reponiendo una vez que se han consumido o si se resecan demasiado (lo que hace que la dieta sea poco apetecible). Debemos evitar que las larvas se queden sin alimento, pues ello acentuaría los problemas de canibalismo y competencia antes mencionados.

Los adultos, conforme van emergiendo, son confinados en los ponederos antes descritos para dar lugar a la siguiente generación. La población es mantenida mediante este método durante generaciones sucesivas, siendo la duración de cada ciclo del insecto de un mes aproximadamente. En los meses de Septiembre y Octubre de cada año se incorpora a la población larvas recogidas en muestreos de campo, con objeto de mantener el vigor y la diversidad genética de la población de cría.

3.2. Las bacterias

Las cepas de las bacterias *Paenibacillus polymyxa* y *P. polymyxa* transformada (con *cry1C*) han sido obtenidas por la Dra. Nahed Abdel Gafaar, del Agriculture Genetic Engineering Research Institute (AGERI) de Egipto. La técnica de obtención de la cepa transformada ha sido descrita por Ibrahim *et al.* (2008) y el gen *cry1C* fue obtenido en el laboratorio del Dr. Donald H. Dean (Universidad de Ohio, USA).

Asimismo, se utiliza el producto comercial Xantari® GD: 15% (15 millones U.I./gramo) p/p suministrado por Kenogard, S.A (Barcelona - España) que tiene como ingrediente activo *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, cuyos cristales contienen Cry1C de forma natural. Para el aislamiento de la bacteria, se toma 1gr del producto y se vierte en un primer tubo (con 10 ml agua destilada estéril), éste se agita fuertemente durante 2-3 minutos y se toma 1 ml que se vierte en el siguiente tubo (con 9 ml) y así sucesivamente hasta completar una serie formada por seis diluciones. Una vez bien agitados los tubos, de cada una de las diluciones se toman 100 µl y se depositan en placas Petri con Agar nutritivo, extendiendo bien con ayuda de un asa de cristal. Las placas se incuban a 30°C durante 48 horas.

3.3. Métodos para determinar la actividad insecticida

3.3.1. Obtención de los inóculos

Los aislados de *P. polymyxa*, *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* se multiplican en medio líquido T3 (5g/l de peptona, 1.5 g/l de extracto de levadura, 0.005g/l MnCl₂ y solución tampón de fosfato sódico 0.5M (pH 6.8) (Traver *et al.*, 1987). En el caso de la bacteria transformada se añadió al medio kanamicina (100 µg/ml) y para *B. thuringiensis* var. *aizawai* se añadió polimixina (50 µg/ml). Los aislados se mantienen en cultivo durante una semana para su multiplicación y la formación de cristales, hecho que se comprueba mediante observación al microscopio óptico en contraste de fase de una preparación del cultivo.

El complejo spora-cristal se extrae por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se resuspende en agua destilada estéril y se lava dos veces por centrifugación. Por último, el precipitado final se resuspende en un cantidad mínima de agua destilada estéril, obteniendo así una suspensión acuosa de esporas y cristales, denominada suspensión madre, que se conserva en tubos Eppendorf estériles a -18 °C.

3.3.2. Riqueza en esporas y cristales de las suspensiones

La titulación de las suspensiones se realiza mediante la cámara Neubauer, la cual consiste en un portaobjeto excavado a 0,1 mm de profundidad, en cuyo fondo hay dibujado un cuadrado de de 1 mm de lado que contiene 16 pequeños cuadrados dispuestos en filas y

columnas, cada uno de los cuales está a su vez dividido en 16 cuadraditos. El volumen de la cámara correspondiente a los cuadrados es de 4×10^{-6} ml.

A partir de cada suspensión madre se preparan diluciones en agua destilada con Tween 80 al 0.1%; seguidamente mediante micropipeta se deposita sobre la cámara una gota de volumen adecuado y se coloca el cubreobjetos. Bajo microscopio óptico en contraste de fases se cuentan las partículas (esporas y cristales) en 5 cuadrados escogidos al azar y el recuento se repite 6 veces para cada aislado. En el caso que exista diferencias significativas entre repeticiones se amplía el número de éstas hasta que no haya diferencias.

Para determinar las concentraciones de las suspensiones en esporas y cristales se aplica la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ esporas y cristales } (E+C)/ml = N/n \times 1/V \times d$$

Siendo:

N= Número total de partículas contadas.

n= Número de cuadrados empleados en los recuentos.

V= Volumen del cuadrado.

D= dilución utilizada.

3.3.3. Métodos de bioensayos

3.3.3.1. Efecto letal

En estos bioensayos se compara, en condiciones de insectario, la toxicidad de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, de *P. polymyxa* transformada y de *P. polymyxa* sin transformar. Para cada bacteria se emplearon una serie de suspensiones, obtenidas por diluciones de la suspensión madre, mas un tratamiento testigo de agua destilada. En todos los tratamientos se añadió Tween 80 al 0,1% como mojante.

La aplicación de la bacteria se realiza depositando con micropipeta 100 μ l de la suspensión correspondiente sobre dieta artificial, la cual fue previamente vertida en el fondo de cajas de plástico de 30 mm de diámetro y 25 mm de altura. Después de dejar secar unos minutos, se introducen en cada caja 10 larvas neonatas de *S. littoralis* procedentes de la población de cría. Las larvas se mantienen en condiciones de insectario durante el tiempo de

duración del bioensayo que fue de 72 horas, momento en el que se realiza el control de la mortalidad larvaria.

Para cada tratamiento se utilizan 10 larvas por repetición y el ensayo se repite un mínimo de 5 veces. Para *P. polymyxa* transformada fue necesario un mayor número de repeticiones (10) con el fin de que el ajuste de la recta de regresión fuera estadísticamente aceptable.

Con los datos de mortalidad obtenidos se determina la relación Dosis-mortalidad mediante análisis de regresión Probit (Finney, 1971). A partir de las rectas de regresión se calcula las correspondientes concentraciones letales medias (CL₅₀).

3.3.3.2. Efectos subletales

Los efectos de dosis subletales de *B. thuringiensis* var. *aizawai* y de *P. polymyxa* transformada se determinan mediante bioensayos utilizando suficiente número de larvas neonatas que se tratan, por el método antes descrito, con una concentración equivalente a la CL₅₀ de cada bacteria (obtenida en los bioensayos del efecto letal). Como testigo se utiliza un tercer grupo de larvas que son tratadas con agua destilada con Tween 80 al 0,1%

Transcurridas 72 horas, 100 larvas supervivientes a cada tratamiento son transferidas individualmente a cajas de plástico de 30 mm de diámetro con dieta artificial. Diariamente se realizan observaciones para reponer el alimento así como anotar el grado de desarrollo, la fecha de pupación de cada larva y la fecha de emergencia del adulto.

Con los datos diarios del estado de desarrollo de las larvas supervivientes a cada uno de los tratamientos, se determinan los tiempos de desarrollo hasta la pupación, así como los periodos de pupación (tiempo entre fechas de pupación y de emergencia como adulto). Las pupas formadas, una vez que su cutícula se esclerotiza (24-48 horas), se sexan por observación en microscopio estereoscópico de los últimos segmentos abdominales y se pesan individualmente en balanza de precisión.

Los adultos supervivientes a cada tratamiento se confinan en ponederos, utilizando un mínimo de 10 parejas (1 pareja/ponedero), según las siguientes combinaciones de apareamiento:

♀ x ♂ Hembra testigo × Macho testigo.

♀_T x ♂_T Hembra tratada × Macho tratado.

Cada hembra, desde el día de la emergencia, se coloca en un ponedero individual cilíndrico, de 12 cm de diámetro y 24 cm de altura, fabricado con papel de filtro. Al cumplir entre 1 y 2 días de edad se le aparea con un macho recién emergido y, a partir de este momento, se realizan controles cada 24 horas para recoger la puesta y proceder al recuento de huevos por observación de los plastones bajo microscopio estereoscópico. Al morir, las hembras son diseccionadas bajo microscopio estereoscópico para anotar el número de espermátóforos presentes en la *bursa copulatrix*, lo que equivale al número de copulaciones realizadas durante su vida. Pasado el periodo de incubación de los huevos, se realiza el recuento bajo microscopio estereoscópico de aquéllos que no eclosionaron (no viables) de cada puesta y por diferencia se obtiene el número de huevos viables. Así obtenemos los datos necesarios para calcular, de cada hembra, el periodo de preoviposición (tiempo desde la emergencia hasta el primer día de puesta), el periodo de oviposición (número de días de puesta), las fecundidades diaria y total, el número de copulaciones y el porcentaje de viabilidad de huevos.

Durante el tiempo en que los adultos se encuentran en sus respectivos ponederos, se hacen observaciones cada 24 horas para anotar la fecha de la muerte de cada uno de ellos. Se calcula así los datos de longevidad o tiempo transcurrido desde la emergencia del adulto hasta su muerte.

3.4. Métodos para determinar la persistencia de la actividad insecticida

Se realizó un primer ensayo en condiciones de campo en el Agriculture Research Center de El Cairo en donde se compararon la persistencia y supervivencia de *P. polymyxa* transformada y *P. polymyxa*. Más tarde, en la Universidad de Córdoba, se realizaron los ensayos en condiciones de semicampo (a partir de agosto de 2010) e invernadero (a partir de mayo de 2010), incluyendo en ambos casos el tratamiento con *B. thuringiensis* var. *aizawai*.

3.4.1. Tratamiento de las plantas

3.4.1.1. En campo

Como inóculos se utilizaron las bacterias *P. polymyxa* transformada y *P. polymyxa* natural, que una vez multiplicadas y esporuladas fueron sometidas a liofilización hasta su uso. Los liofilizados se resuspendieron en agua hasta una concentración final de 1000 ppm, a los

que se añadió goma arábica (1%) y Tween 20 (al 0,1%).

Las suspensiones fueron aplicadas con un pulverizador manual sobre plantas de algodón de cuatro semanas de edad mantenidas al aire libre. Finalmente se dejaron secar 2 horas antes de iniciar la toma de muestras. Para ello, en diferentes periodos después del tratamiento (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 336, 504 y 720 horas) se tomaron al azar dos hojas, de las cuales una de ellas se usó para este ensayo de persistencia de la actividad y la otra para la determinación de la supervivencia de la bacteria en el interior de los tejidos foliares.

3.4.1.2. En condiciones de semicampo e invernadero

Como inóculos se utilizaron las bacterias *P. polymyxa* transformada y *P. polymyxa* natural y *B.thuringiensis* var. *aizawai*, que se habían obtenido previamente como suspensiones purificadas de esporas y cristales (ver 3.3.1). Se hicieron ensayos en condiciones de semicampo, donde un grupo de plantas de algodón fueron mantenidas bajo umbráculo y otro grupo en condiciones de invernadero en las instalaciones del Campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba.

En semicampo las concentraciones utilizadas para *P. polymyxa* transformada y *B.thuringiensis* var. *aizawai* fueron respectivamente de $130,64 \times 10^7$ c+e/ml y $8,86 \times 10^7$ e+c/ml (correspondientes a las CL₉₀ obtenidas en bioensayos previos de toxicidad). De *P. polymyxa* sin transformar se utilizó una suspensión con igual concentración de esporas que *P. polymyxa* transformada ($65,32 \times 10^7$ esporas/ml). De igual forma se procedió para determinar las concentraciones de las suspensiones aplicadas en las plantas de invernadero, que fueron respectivamente de $3,52 \times 10^8$ y $5,54 \times 10^8$ e+c/ml y de $1,91 \times 10^8$ esporas/ml. A todas las suspensiones se le añadió Tween 80 al 0,1%

Las suspensiones son aplicadas con un pulverizador manual sobre plantas de algodón de 4 semanas de edad, junto a un tratamiento testigo de agua con Tween 80 al 0,1% Después de dejar secar 2 horas, se inicia la toma de muestras en diferentes periodos de tiempo después del tratamiento (1, 7, 14, 21 y 28 días). En cada fecha, se eligen al azar dos hojas de cada tratamiento, una de ellas se usará para este ensayo de persistencia de la actividad y la otra para la determinación de la supervivencia de la bacteria en el interior de los tejidos foliares.

3.4.2. Evaluación de la toxicidad

Para evaluar la persistencia de la toxicidad de *P. polymyxa* transformada, las hojas de algodón seleccionadas se colocaron separadamente en placa Petri (16cm de diámetro y 3,5cm de altura) en condiciones de insectario y se infestaron artificialmente con 10 larvas neonatas de *S. littoralis*. A las 72 horas se realizó el control de mortalidad larvaria. Para cada tiempo después de la aplicación se realizaron tres repeticiones.

3.5. Métodos para determinar la supervivencia en el interior del tejido vegetal

Las muestras de hojas previamente pesadas, procedentes de las plantas tratadas (ver 3.4.1) con los distintos inóculos y condiciones ambientales, se desinfectan superficialmente por inmersión en hipoclorito sódico al 10% durante 10 min y se lavan tres veces con agua destilada estéril. Seguidamente, se cortan en pequeños trozos que se sometieron a inmersión y agitación suave en 40 ml de una solución estéril de MgSO₄ 100mM durante 15 min para la liberación de la bacteria fijada al tejido. Con el líquido resultante se hicieron tres diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) y cada suspensión fue cultivada añadiendo 100 µl en placa Petri (2 placas/suspensión) con medio LB sólido (triptona 10g/l, levadura 5g/l, cloruro sódico 5g/l y agar 15g/l) y se incubaron a 30°C durante la noche. En el caso de la bacteria transformada se añadió al medio kanamicina (100 µg/ml) y para *B. thuringiensis* var. *aizawai* se añadió polimixina (50 µg/ml).

Finalmente se calculan las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) como valor medio de los recuentos de las placas y se determinan los valores de UFC/g peso seco (Sudha *et al.* 1999). La supervivencia de la población bacteriana fue expresada en Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/g peso seco) según la ecuación (Hedges, 2002):

$$\text{Número UFC/g} = \frac{\text{N/ml} \times \text{Vol} \times \text{PF}}{\text{Dilución} \times \text{RFS}}$$

Siendo:

N = N° colonias por placa

Vol = Volumen de la suspensión madre (40 ml)

PF = Peso fresco de las hojas de cada muestra.

RFS = Relación Peso fresco/Peso seco de hojas de algodón

La relación peso fresco/peso seco de las hojas (RFS) de algodón se calcula en cuatro muestras de hojas que se pesan en fresco (más de 3 gr/muestra) y luego se mantienen en estufa a 70°C durante 24 horas, tras lo cual se vuelven a pesar para determinar el peso seco.

3.6. Detección de las bacterias en los tejidos foliares

3.6.1. Detección de Cry 1C por SDS-PAGE

La detección de Cry1C se lleva a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida mediante el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970).

Se utilizan dos tipos de muestras:

1) Bacterias de *P. polymyxa* transformada, *P. polymyxa* original y *B. thuringiensis* var *aizawai* fueron cultivadas a partir de los inóculos originales en 5 ml de medio líquido LB. Se toman muestras de células vegetativas y posteriormente de las células esporuladas (que fueron sometidas a agitación de 200 rpm a 30°C hasta la autólisis). Volúmenes de 1,5 ml del cultivo fueron centrifugados en tubos Eppendorf a 7000 rpm y el precipitado lavado tres veces en agua bidestilada y después de eliminar el sobrenadante se añade 80 µl de agua.

2) Hojas de plantas de algodón mantenidas en invernadero que habían sido tratadas por pulverización con suspensiones purificadas de esporas y cristales de *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* a la concentración equivalente a la CL₉₀, así como de esporas de *P. polymyxa* a la misma concentración que la transformada. Las hojas se tomaron 14 días después de los tratamientos y antes de su procesado fueron superficialmente desinfectadas con hipoclorito sódico al 10% durante 10 min y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Finalmente fueron trituradas en Nitrógeno líquido usando un mortero esterilizado y conservadas a -20°C.

Reactivos

Monómero: 29 mg de acrilamida y 1 mg de N,N bis-metilen-acrilamida fueron disueltos en la cantidad suficiente de agua bidestilada y luego completado hasta un volumen de 100 ml. Después de filtrar en Whatmann n°1, la solución fue mantenida en frasco oscuro a 4°C hasta su uso.

Tris-base 1.5 M: 18,16 mg de Tris-base fueron disueltos en suficiente cantidad de agua bidestilada, el pH fue ajustado a 8.8 con HCl concentrado, luego el volumen fue completado a 100 ml con agua bidestilada. Después de filtrado fue mantenido a 4°C.

Tris-base 0.5M: 6,05 mg de Tris base fueron disueltos en suficiente cantidad de agua bidestilada, el pH fue ajustado a 8.8 con HCl concentrado, luego el volumen fue completado a 100 ml con agua bidestilada. Después de filtrar fue mantenido a 4°C.

SDS 10%: 1 mg de SDS fue disuelto en suficiente cantidad de agua bidestilada y luego el volumen fue completado hasta 100 ml. Después de filtrar fue mantenido a temperatura ambiente.

Persulfato amónico 10%: 100 mg de persulfato amónico fueron disueltos en 1 ml agua bidestilada (recién preparada).

Trampón Tris-glicina (tampón de electrodo) (4x): 12,1 g de Tris-base, 57,6 g de glicina y 2 g de SDS fueron disueltos en suficiente cantidad de agua bidestilada y luego completado hasta 1 litro de solución que fue mantenida a 4°C y diluida añadiendo 3 volúmenes de agua bidestilada antes de su uso.

Tampón para muestras (2x): 2.5 ml de Tris-base 0.5M, 4 ml SDS 10% y 2ml de β -mercaptoetanol fueron mezclados junto a unas gotas de azul de bromofenol al 1% y luego completado hasta 10 ml con agua bidestilada.

Tinción-SDS: 0.5 mg de Comassie Brilliant Blue fueron disueltos en suficiente cantidad de agua bidestilada, luego fueron añadidos 250 ml de metanol y 50 ml de ácido acético glacial y agua bidestilada hasta completar 500 ml. Después del filtrado, la solución fue mantenida a temperatura ambiente.

Solución de desteñido: 250 ml de metanol, 50 ml de ácido acético glacial y 200 ml de agua bidestilada fueron mezclados y mantenidos a temperatura ambiente.

Marcador de proteínas: Marcador de amplio espectro de pesos moleculares (BioRad, cat # 160318, control 90677), que contiene las siguientes proteínas: miosina (Mr. 205,000), β -galactosidasa (Mr.119,000), albúmina de suero de bovino (Mr.98,000), Ovoalbúmina (Mr.52,300), anhidrasa carbónica (Mr.36,800), Inhibidor de la tripsina de soja (Mr.30,100), (Mr.22,000), Aprotinina (Mr.7,600). El contenido del vial fue reconstituido con 0,5 ml de buffer 1x. Se usaron 10 μ l por gel. El vial fue mantenido a - 20° C hasta su posterior uso.

Preparación del Gel

Se preparó una solución del gel separador (10%) mezclando 10 ml de monómero, 7.5 ml de Tris base 1.5 M, 300 µl de SDS 10 %, 150 µl de persulfato amónico 10% y 10µl de TEMED, y el volumen fue completado con agua bidestilada hasta 30 ml. Las burbujas de aire deben ser retiradas, usando una bomba de succión, antes de añadir el persulfato amónico y TEMED. Placas de electroforesis (Bio-Rad Mini-protean 2 cell) con longitud total de 8.5 cm y diámetro interno de 0.75 mm, fueron colocadas en posición vertical. El gel separador fue vertido lentamente, usando una pipeta Pasteur, entre las dos pacas hasta llenar 6 cm desde la parte inferior. Aproximadamente 3 ml de agua bidestilada fue depositada encima de la superficie superior del gel para obtener una superficie suave y horizontal. El gel fue así mantenido durante un tiempo mínimo de 1,5 horas para su completa polimerización.

Se preparó la solución del gel de carga al 4% mezclando 1,33 ml de monómero, 2.5 ml de Tris base 0,5M, 100 µl de SDS 10%, 50 µl de persulfato amónico 10% y 5 µl de TEMED, completando el volumen con agua destilada hasta 11 ml. La capa superior de agua bidestilada fue drenada y reemplazada por el gel de carga. El peine fue colocado en el gel de carga que se mantuvo durante al menos una hora hasta su completa polimerización. Los geles fueron sumergidos en el tampón de electrodo.

Cantidades iguales de la muestra y tampón son mezcladas y llevadas al baño térmico para hervir durante 90 seg, tras lo cual son mantenidas sobre hielo. Las muestras son depositadas en los pocillos usando una jeringuilla, incluyendo el Marcador de proteínas.

Finalmente se lleva a cabo la electroforesis del gel con el tampón del electrodo a 100 V durante 1 hora aproximadamente. Transcurrido el tiempo necesario, el gel fue colocado con cuidado en bandeja con la Tinción-SDS durante 12 horas. El exceso del colorante fue retirado por exposición a la solución de desteñido durante 2 horas.

3.6.2. Detección del gen *cry1C* por PCR

Extracción del ADN

A partir de cultivos en medio LB, se tomaron en tubos Ependorf volúmenes de 10 µl a los que se añadieron 90 µl de agua destilada estéril. que se mantienen en agitación y se hierven durante 10 minutos para la lisis de las células. Las células lisadas se centrifugan a 10000 rpm durante 10 seg y el sobrenadante se somete a la PCR.

PCR y primers

Se siguió el protocolo descrito por Ceron *et al.*(1995) y Carozzi *et al.* (1991). Se utilizaron dos pares de primers específicos para *cry1C*. Los dos primeros IAF y IAR. IAF: 5'' ACG GAG GAT CCA TAT GGA GGA AAA TAA TCA AAA TC 3''; IAR: 5'' CTC TTG GAT CCT AAC GGG TAT AAG CTT TTA ATT TC 3'' (Regev *et al.*, 1996) . Con las mismas condiciones de reacción se usó un segundo par de primers: IAF y ICR: 5'' TTA TTC CTC CAT AAG GAG TAA TTC C 3'' (Ibrahim *et al.*, 2008).

Las condiciones de la reacción han sido descritas por Regev *et al.* (1996). Se utiliza un volumen total de 50 µl que contienen 5µl de ADN total, 50 pmol de cada primer, 4 µl de Desoxi Trifosfato Nucleósidos 2,5 mM, 1 µl de Taq DNA polimerasa, 5 µl de buffer enzima 10X y 2,5 µl de MgCl₂. La amplificación se lleva acabo en un termociclador de ADN (Perkin Elmer) usando un solo paso de desnaturalización (2min a 95°C). La reacción consistió en 30 ciclos de 95°C (1 min), 48°C (1 min) y 72°C (1 min) y finalmente 5 min a 72°C.

Electroforesis en gel de agarosa

La presencia del gen *cry1C* en los productos amplificados por PCR se detectó mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 1,2% Para ello se procedió de la siguiente forma:

- Se prepara tampón TBE 10x mezclando 180 g de Tris, 67,5 g de ácido bórico, 9,3 g de EDTA en 1 litro de agua bidestilada, ajustando el pH a 8,3.
- Se prepara gel de agarosa al 1,2% añadiendo 1,74 g de agarosa en 15 ml de la solución tampón TBE 10x y 130 ml de agua bidestilada. La mezcla se calienta a 60° durante 10-15 min hasta que quede transparente.
- El gel se vierte en una bandeja horizontal, se coloca el peine y se deja durante al menos una hora hasta su completa polimerización. La bandeja se deposita en la cubeta de electroforesis.
- Se preparan una solución de 250 ml de tampón TBE y 12,5 µl de bromuro de etidio que se vierte en la cubeta hasta cubrir el gel.
- En tubos Eppendorf se mezclan 26 µl de ADN y 3 µl de azul de bromofenol y cada una de las muestras se depositan en un orificio del gel y se conecta la cubeta a la fuente de electroforesis a 30 V durante la noche. Finalmente el gel se lleva a la fuente de radiación ultravioleta y se fotografía.

- Como control positivo se utiliza pHTNC3, plásmido recombinante que resulta de clonar el gen *cry1C* en el vector pHT7593 (Ibrahim *et al.*, 2008). Este plásmido fue el usado en la transformación de la cepa de *P. polymyxa* (Ibrahim y Omar, 2009).

- El marcador de ADN fue 1Kb ladder DNA marker (aMResco product); que contiene 11 bandas de ADN lineal de doble cadena de: 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 y 10000 pb.

3.7. Selección de resistencia de *S. littoralis* a las bacterias

A partir de la población de *S. littoralis* de laboratorio, se establecen dos líneas de selección, una mediante tratamientos sucesivos con *P. polymyxa* transformada y otra con *B. thuringiensis* var. *aizawai*. Para ello, larvas neonatas de *S. littoralis* son tratadas, mediante el método antes descrito (ver 3.3.3.2) con una concentración equivalente a la CL₅₀ de cada bacteria. De forma simultánea, como testigo, otro grupo de larvas de la misma edad de la población original son alimentadas con dieta sin tratar. Este tratamiento se repite durante 12 generaciones.

3.7.1. Susceptibilidad

La evolución de la susceptibilidad a la bacteria para las respectivas poblaciones de selección se realiza mediante la determinación de las rectas de regresión Probit y las respectivas CL₅₀ en las generaciones de selección cuarta, octava y duodécima, siguiendo el método de bioensayo antes descrito (ver 3.3.3.1). El número de repeticiones de cada bioensayo fue el necesario para el buen ajuste de las rectas de regresión Probit, oscilando entre 3 y 12. Cuando existió mortalidad en el testigo, los porcentajes de mortalidad en los demás tratamientos se corrigieron mediante la fórmula de Abbott (1925):

$$\%Mortalidad\ Corregida = \frac{\%Mortalidad\ Observada - \%Mortalidad\ Testigo}{100 - \%Mortalidad\ Testigo} \times 100$$

Las rectas de regresión se comparan estadísticamente (Finney, 1971) entre las poblaciones de selección para cada una de las generaciones analizadas, así como entre las generaciones de cada población de selección.

A partir de las CL₅₀ obtenidas en las generaciones de selección de cada población, se determina el Factor de Resistencia (FR) dividiendo cada valor entre la CL₅₀ de la generación inicial.

3.7.2. Potencial biológico de las poblaciones seleccionadas

Se realizaron ensayos para determinar el potencial biológico de las poblaciones de la última generación de selección para *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* junto a la población no seleccionada. Larvas neonatas de la duodécima generación de cada población fueron individualizadas en caja de plástico de 30 mm de diámetro y alimentadas con la dieta artificial. Diariamente se realizan observaciones para anotar el grado de desarrollo, la fecha de pupación de cada larva y la fecha de emergencia del adulto. Los parámetros del potencial biológico de estas generaciones se calculan siguiendo las metodologías descritas para el estudio de los efectos subletales (ver 3.3.3.2).

3.8. Influencia de la *Paenibacillus polymyxa* sobre la planta

3.8.1. Fijación de nitrógeno en planta

El nitrógeno total se determinó en plantas tratadas en pulverización con 1000 ppm de *P. polymyxa* sin transformar y de *P. polymyxa* transformada. Dos semanas después del tratamiento se tomó la parte epigea de cada planta y se procedió a su análisis con el método Micro Kjeldahl, usando una mezcla de H₂SO₄ + HClO₃ (1:1). El contenido de N se calcula de acuerdo al procedimiento de Page *et al.* (1982) mediante la fórmula:

$$\text{mg N/planta} = \%N \times \text{Peso seco (g)/planta} \times 10$$

3.8.2. Actividad nitrogenasa en suelo

La actividad de la nitrogenasa (N₂-asa) en el suelo se midió mediante el ensayo de la actividad reductora del acetileno (ARA), según el método descrito por Hardy *et al.* (1973) y Somasegaran y Hoben (1985), de la siguiente manera:

- Una muestra de 100 g de suelo activo se humedece con la suficiente cantidad de una fuente de carbono que contiene 0,5 g de ácido málico, 0,5 g de almidón, 0,5 g de glucosa, 0,5

g de manitol ó glicerol en agua al 2%, y luego se incuba a 28 °C durante 72 h.

- Las muestras son transferidas a frascos de 300 ml que son sellados con tapón (goma de silicona) para evitar cualquier fuga de aire y gas.

- El diez por ciento del volumen libre del frasco fue sustituido por igual volumen de gas acetileno (Volumen inyectado) y las muestras fueron incubadas a 28 °C durante 2 h y 24 h. Después, la fase gaseosa de los frascos se mezcla bien y se toman 0,5 ml de cada frasco para la medida de etileno mediante cromatografía de gases (GC, DANI 1000) con ionización de llama.

- Antes de analizar la muestra se estableció la curva estándar con diferentes concentraciones de etileno en el aire. Una relación lineal entre la concentración de etileno y el nivel máximo de etileno se obtuvo para cada atenuación.

- Para calcular la cantidad etileno en la muestra, las alturas de los picos se mide en centímetros, y se convierte al equivalente en μmol de C_2H_4 usando factores de multiplicación derivados de la curva estándar.

- La cantidad de etileno en la muestra (μmol) fueron convertidas a $\mu\text{moles/g}$ dividiendo por el volumen del peso molecular del gas. Los valores de ARA se determinaron a partir de la lectura del cromatógrafo según la fórmula:

$$ARA(\mu\text{mol} / \text{g} / \text{h}) = R \times \frac{V_f}{V_i} \times \frac{1}{T_i} \times \frac{1}{PS} \times \frac{1000}{P_m}$$

Siendo

R : Lectura cromatógrafo

V_f: Volumen total del frasco

V_i: Volumen inyectado de acetileno

T_i: Tiempo de incubacion

PS: Peso seco de la muestra

P_m: Peso molecular del etileno

3.8.3. Contenido en clorofila y carotenoides

Se sigue el método descrito por Hiscox y Israelstam (1979). Se tomaron 10 mg de la muestra (trozos pequeños de hoja) que son introducidos en un tubo de ensayo con 7 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) durante la noche para extraer la clorofila y los carotenoides. El

extracto se filtra, se transfiere a un tubo graduado y se completa con DMSO hasta un volumen de 10 ml. Para la determinación de la clorofila se midió la absorbancia (A) mediante Spectronic 20 a 644 y 662 nm, y para los carotenoides a 470 nm. Los contenidos de clorofila A (C A), clorofila B (C B) y clorofila total (C AB) se calcularon utilizando la ecuación de Arnon (1949), y para los carotenoides la de Villanueva *et al.* (1985).

Ecuaciones de Arnon:

$$C A = 12,7 \times A_{662} - 2,69 \times A_{644}$$

$$C B = 22,9 \times A_{644} - 4,68 \times A_{662}$$

$$C AB = 20,2 \times A_{644} + 8,02 \times A_{662}$$

Ecuación de Villanueva:

$$\text{Carotenoides} = [A_{470} - 1,28 (C A) + 56,7 (C B)] / (256 \times 0,906)$$

siendo:

$$C A = \text{Clorofila A (mg/l)}$$

$$C B = \text{Clorofila B (mg/l)}$$

$$C AB = \text{Clorofila A+B (mg/l)}$$

3.9. Análisis estadísticos

3.9.1. Análisis de regresión Probit

La regresión cualitativa Probit permite estimar las rectas de regresión dosis-mortalidad. Se emplea el método de máxima verosimilitud para obtener los parámetros de dichas rectas, el cual se basa en el análisis de Finney (1971). La bondad del ajuste se realiza con un test de χ^2 al 5% de nivel de significación. Las ecuaciones de las rectas de regresión nos permiten determinar las concentraciones letales medias (CL50) con sus límites fiduciales al 95%.

Para la comparación de rectas de regresión, el test χ^2 de paralelismo nos permite comprobar si hay diferencias entre las pendientes. En caso de no ser significativo, realizamos una nueva estimación de las rectas con la condición de pendiente común (Finney, 1971), lo que hace posible obtener las potencias relativas entre productos.

Para las estimaciones de las rectas ajustadas independientemente y de las rectas con la condición de paralelismo, así como para el cálculo de las potencias relativas se utiliza el programa POLO (LeOra Software Inc. Berkeley, CA, USA) basado en el modelo Finney (1971). Para determinar si hay diferencias significativas al 5% entre las CL50 y entre las potencias relativas, se utiliza el criterio de no solapamiento de los intervalos definidos por los límites fiduciales al 95%.

3.9.2. Análisis de la varianza

Los datos relativos a los tiempos letales medios y los valores obtenidos en los ensayos de desarrollo y reproducción, son sometidos a análisis de la varianza. En el caso de existir diferencias significativas, las medias se comparan con la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) al 5% de nivel de significación. Todos los análisis se realizan mediante el programa STATISTIX 8.0.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Actividad insecticida

4.1.1. Efecto letal

La mortalidad de larvas de primer estadio de *S. littoralis* tratadas con *B. thuringiensis* var. *aizawai* y con *P. polymyxa* transformada incrementó con la concentración del inóculo, mientras que con *P. polymyxa* no transformada no causó mortalidad alguna (Tabla 1).

Tabla 1. Mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* tratadas en primer estadio con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx), *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) y *Paenibacillus polymyxa* (Pp).

Tratamiento	Concentración espora+cristal/ml	Nº larvas tratadas	Nº larvas muertas	% Mortalidad
Btx	0	111	0	0,00
	0,68x10 ⁶	100	1	1,00
	2,10x10 ⁶	100	7	7,00
	6,16x10 ⁶	95	7	7,37
	18,47x10 ⁶	100	30	30,00
	55,40x10 ⁶	100	33	33,00
	166,20x10 ⁶	100	67	67,00
Ppt	0	50	0	0,00
	6,12x10 ⁶	51	1	1,96
	18,40x10 ⁶	51	9	17,65
	55,06x10 ⁶	50	20	40,00
	165,30x10 ⁶	50	36	72,00
	495,90x10 ⁶	50	48	96,00
Pp	0	50	0	0
	3,06x10 ⁶	50	0	0
	9,18x10 ⁶	50	0	0
	27,57x10 ⁶	50	0	0
	82,62x10 ⁶	50	0	0
	247,86x10 ⁶	50	0	0

Los resultados del análisis de regresión Probit de los porcentajes de mortalidad causados por cada bacteria se reflejan en la tabla 2. Los valores de la prueba χ^2 indican un buen ajuste de ambas rectas, cuyas pendientes estuvieron cercanas a la unidad, aunque difirieron significativamente entre sí. La pendiente más baja correspondió a la recta referida al *P. polymyxa* transformada.

La actividad tóxica del *P. polymyxa* transformada tuvo una CL_{50} de $70,38 \times 10^6$ espora+cristal/ml, valor menor que el correspondiente al *B. thuringiensis* var. *aizawai* ($84,71 \times 10^6$ espora+cristal/ml), aunque la diferencia no fue significativa como se deduce por el solape de los intervalos fiduciales al 95%.

Tabla 2. Rectas de regresión Probit y CL_{50} de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y de *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry 1C*) (Ppt) en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis*.

Tratamiento	χ^2	gdl	Recta de regresión	CL_{50} espora+cristal /ml	Límites fiduciales 95%	
					Inferior	Superior
Btx	9,46	4	$y = 1,06x + 2,96$	$84,71 \times 10^6$	$45,02 \times 10^6$	$240,09 \times 10^6$
Ppt	1,28	3	$y = 1,83x + 1,62$	$70,38 \times 10^6$	$54,86 \times 10^6$	$90,90 \times 10^6$

χ^2 = test para la bondad del ajuste

4.1.2. Efectos de dosis subletales de *B. thuringiensis* var. *aizawai* y *Paenibacillus polymyxa* transformada en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis*

En los bioensayos para conocer los efectos subletales de *B. thuringiensis* var. *aizawai* y *P. polymyxa* transformada, se trataron larvas de *S. littoralis* en primer estadio con la correspondiente CL_{50} , tal como se indica en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. Los resultados sobre el desarrollo y reproducción de los supervivientes al tratamiento se detallan a continuación.

Desarrollo de estados inmaduros

En la tabla 3 se muestra el tiempo de desarrollo larvario, desde el momento del tratamiento hasta la pupación, de los individuos supervivientes a la aplicación con *B.*

thuringiensis var. *aizawai* y con *P. polymyxa* transformada. Se observa que el valor medio para las larvas hembras tratadas con *B. thuringiensis* var. *aizawai* (25,14 días) fue significativamente mayor que para las tratadas con *P. polymyxa* transformada (22,85 días) difiriendo ambos tratamientos respecto del testigo ($p < 0,0001$). En el caso de las larvas macho se dieron las mismas diferencias ($p < 0,0001$), con valores de 24,67 días y 21,81 días, respectivamente.

Tabla 3. Periodo de desarrollo de larvas de *Spodoptera littoralis* tratadas con la concentración letal media de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Sexo	Tratamiento	N	Tiempo (días)		
			Media	Intervalo	SE
♀	Testigo	41	19,29 a	18-24	0,22
	Btx	36	25,14 c	21-28	0,26
	Ppt	33	22,85 b	19-28	0,29
♂	Testigo	42	18,81 a	17-21	0,25
	Btx	43	24,67 c	21-27	0,25
	Ppt	36	21,81 b	19-30	0,27

Medias seguidas de la misma letra indica que no difieren significativamente al 95%.
SE = Error estándar de la media.

Según se observa en la tabla 4, independientemente del tratamiento, el periodo de pupación de los machos fue alrededor de dos días superior al de hembras. En el tratamiento con *B. thuringiensis* var. *aizawai* disminuyó con respecto al testigo en los dos sexos, con diferencia significativa ($p < 0,0001$) en los machos. Por el contrario, el tratamiento con *P. polymyxa* transformada aumentó el periodo de pupación de ambos sexos, con diferencia significativa para las hembras ($p = 0,0021$).

En la tabla 5, se muestra el peso de las pupas. Los tratamientos con *B. thuringiensis* var. *aizawai* y con *P. polymyxa* transformada disminuyeron significativamente el peso de pupas de ambos sexos ($p < 0,0001$).

Tabla 4. Periodo de pupación de *Spodoptera littoralis* en los tratamientos de larvas con la concentración letal media de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Sexo	Tratamiento	N	Tiempo (días)	
			Media	SE
♀	Testigo	41	13,41 a	0,19
	Btx	36	13,25 a	0,23
	Ppt	33	14,18 b	0,24
♂	Testigo	42	15,87 a	0,15
	Btx	43	15,19 b	0,18
	Ppt	36	15,94 a	0,19

Medias seguidas de la misma letra, para cada sexo, indica que no difieren significativamente al 95%.

Tabla 5. Peso de pupas de *Spodoptera littoralis* en los tratamientos de larvas con la concentración letal media de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Sexo	Tratamiento	N	Peso (gr)	
			Media	SE
♀	Testigo	41	0,4837 a	0,0072
	Btx	36	0,4156 b	0,0076
	Ppt	33	0,4182 b	0,0079
♂	Testigo	42	0,4190 a	0,0058
	Btx	43	0,3537 c	0,0057
	Ppt	36	0,3811 b	0,0062

Medias seguidas de la misma letra, para cada sexo, indica que no difieren significativamente al 95%.

Reproducción

Como se observa en la tabla 6, todas las parejas copularon, todas las hembras copuladas fueron fecundas y de éstas la mayoría fueron fértiles, tanto en el testigo como en las tratadas con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* y tratadas con *P. polymyxa* transformada.

Tabla 6. Respuesta de las hembras de *Spodoptera littoralis* en parejas procedentes de larvas tratadas con la concentración letal media de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

COMBINACIÓN	N	Nº HEMBRAS		
		Copuladas	Fecundas	Fértiles
♀ X ♂	22	22	22	22
♀ Btx X ♂ Btx	18	18	18	18
♀ Ppt X ♂ Ppt	18	18	18	17

N = Número de parejas.

Se estudiaron dos índices que sirven para estimar el nivel de crecimiento de una población en la siguiente generación: el número de huevos puestos por hembra (fecundidad) y el porcentaje de viabilidad de éstos. Además, se determinó el número medio de espermatozoides por hembra, lo que representa el número de copulaciones de las hembras durante su vida. Los valores obtenidos se reflejan en la tabla 7.

La fecundidad media en el testigo fue de 927,27 huevos/hembra, mientras que en las parejas tratadas los valores fueron ligeramente inferiores, sin que se alcanzase diferencias significativas ($p=0,6695$). En cuanto al porcentaje de viabilidad de huevos, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0005$) con reducción en las parejas tratadas con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* y en las tratadas con *P. polymyxa* transformada. No hubo diferencias significativas ($p=0,9110$) en el número medio de espermatozoides presente en la hembra; en general las hembras copularon una vez durante su vida, aunque algunas tuvieron dos copulaciones.

Tabla 7. Potencial reproductor de *Spodoptera littoralis* en parejas procedentes de larvas tratadas con la concentración letal media de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

COMBINACIÓN	N	Nº HUEVOS / ♀		% VIABILIDAD		Nº ESPF., /♀
		Media	Intervalo	Media	Intervalo	
♀ x ♂	22	927,27 a	425-1375	82,34 a	50,00-100	1,77 a
♀ Btx X ♂ Btx	18	834,22 a	250-1675	53,73 b	5,71-98,33	1,78 a
♀ Ppt X ♂ Ppt	18	837,22 a	225-1800	56,58 b	0,00-95,74	1,67 a

N=Número de parejas.

Medias seguidas de la misma letra en cada columna indican que no difieren significativamente al 95%

Para cada uno de los tratamientos se han estudiado los períodos de preoviposición (tiempo transcurrido desde la emergencia de la hembra hasta el inicio de puesta), días de oviposición y días de puesta viable (Tabla 8). No hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros.

Tabla 8. Periodos de puestas de *Spodoptera littoralis* en parejas procedentes de larvas tratadas con la concentración letal media de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

COMBINACIÓN	N	Nº DÍAS DE PREOVIPOSICIÓN		Nº DÍAS DE PUESTA		n	Nº DE PUESTAS VIABLES	
		Media	Intervalo	Media	Intervalo		Media	Intervalo
		♀ x ♂	22	2,77 a	1-6		3,32 a	2-5
♀ Btx X ♂ Btx	18	3,06 a	1-5	3,56 a	1-5	18	3,39 a	1-4
♀ Ppt X ♂ Ppt	18	2,89 a	1-5	2,94 a	2-6	17	2,83 a	1-4

N=Número de hembras fecundas; n=Número de hembras con puestas viable.

Medias seguidas de la misma letra en cada columna indican que no difieren significativamente al 95%.

En la tabla 9 se muestran las longevidades medias de machos y hembras en cada uno de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas en las longevidades de machos ni de hembras.

Tabla 9. Longevidad (en días) de machos y hembras de *Spodoptera littoralis* procedentes de larvas tratadas con la concentración letal media de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

COMBINACIÓN	N	MACHOS		HEMBRAS	
		Media	Intervalo	Media	Intervalo
♀ X ♂	22	9,86 a	7-13	9,23 a	7-12
♀ Btx1 X ♂ Btx1	18	10,22 a	6-15	9,72 a	6-15
♀ Ppt1 X ♂ Ppt1	18	9,44 a	5-14	9,89 a	6-11

N=Número de parejas. Medias seguidas de la misma letra en cada columna indican que no difieren significativamente al 95%.

4.2. Persistencia de la actividad insecticida y supervivencia en hojas de algodón de *Paenibacillus polymyxa* transformada y su comparación con las otras dos cepas

4.2.1. En condiciones de campo

En la tabla 17, figura 9 se muestra la evolución de la actividad insecticida del *P. polymyxa* transformada en larvas de primer estadio de *S. littoralis* que han ingerido hojas de algodón entre 2 y 720 horas después del tratamiento con 1000 ppm de la bacteria. Los porcentajes de mortalidad oscilaron entre 46,7 y 100%, siguiendo una tendencia ligeramente descendente llegando al final del ensayo a producir una mortalidad 50% de las larvas tratadas.

La persistencia de *P. polymyxa* en el interior de las hojas de algodón se puede deducir de los resultados de la tabla 17. En las hojas superficialmente esterilizadas se encontraron altos niveles de supervivencia de la bacteria establecida en los tejidos foliares al menos hasta 720 horas después del tratamiento.

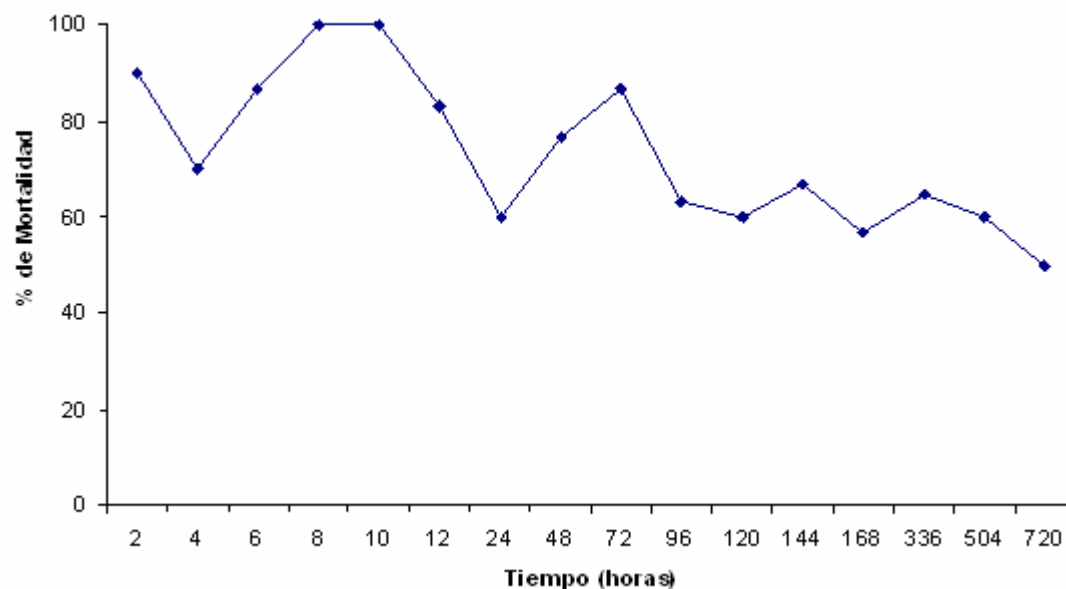


Figura 9. Persistencia de la actividad insecticida de *Paenibacillus polymyxa* transformada sobre larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* en hojas de algodón tratadas en campo por pulverización de cristales y esporas.

Tabla 17. Supervivencia y persistencia de la actividad insecticida de *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) y *Paenibacillus polymyxa* no transformada (Pp) en hojas de algodón tratadas por pulverización en condiciones de campo.

Horas después del tratamiento	Ppt		Pp	
	Supviv. UFC/ g peso fresco	% mortalidad	Supviv. UFC/ g peso fresco	% mortalidad
2	0,49 x 10 ⁴	90	0,65 x 10 ⁴	0
4	0,18 x 10 ⁴	70	1,40 x 10 ⁴	0
6	0,06 x 10 ⁴	86	0,36 x 10 ⁴	0
8	0,20 x 10 ⁴	100	0,54 x 10 ⁴	0
10	0,04 x 10 ⁴	100	0,44 x 10 ⁴	0
12	0,06 x 10 ⁴	83	0,42 x 10 ⁴	0
24	0,10 x 10 ⁴	60	0,11 x 10 ⁴	0
48	0,30 x 10 ⁴	76	0,14 x 10 ⁴	0
72	0,11 x 10 ⁴	86	0,15 x 10 ⁴	0
96	0,86 x 10 ⁴	63	0,51 x 10 ⁴	0
120	0,19 x 10 ⁴	60	0,40 x 10 ⁴	0
144	0,15 x 10 ⁴	66	0,62 x 10 ⁴	0
168	0,24 x 10 ⁴	56	0,86 x 10 ⁴	0
336	1,73 x 10 ⁴	46	0,24 x 10 ⁴	0
504	0,59 x 10 ⁴	60	0,35 x 10 ⁴	0
720	2,52 x 10 ⁴	50	0,25 x 10 ⁴	0

4.2.2. En condiciones de semicampo (umbráculo)

En la tabla 18 y figura 10, se muestra la evolución de la actividad insecticida del *P. polymyxa* no transformada, *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* en larvas de primer estadio de *S. littoralis* que han ingerido hojas de algodón tratadas en umbráculo entre 1 y 28 días después del tratamiento. Los porcentajes de mortalidad oscilaron entre 21,11-81 y 5,56-70 % para *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* respectivamente. Se observa una tendencia inicial hacia la disminución de mortalidad en ambos tratamientos, pero a los 28 días las mortalidades siguen siendo relativamente altas

(50.0 y 45,5 %, respectivamente). Los tratamientos Testigo y *P. polymyxa* no transformada, como era de esperar, no causaron mortalidad larvaria.

La persistencia de *P. polymyxa* transformada, *P. polymyxa* no transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* en el interior de las hojas de algodón se encontraron niveles de supervivencia (Tabla 18; figura 11) que se mantuvieron con valores similares desde el primer día después del tratamiento, destacando solamente un aumento a los 28 días en el caso de *P. polymyxa* transformada.

Tabla 18. Supervivencia y persistencia de la actividad insecticida del *Paenibacillus polymyxa* no transformada (Pp), *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) en hojas de algodón en condiciones de umbráculo.

Días	Testigo		Pp		Ppt		Btx	
	Supviv. UFC/g peso seco	% mort.	Supviv. UFC/g peso seco	% mort.	Supviv. UFC/g peso seco	% mort.	Supviv. UFC/g peso seco	% mort.
1	0	0	0,17 x10 ⁴	0	0,46 x10 ⁴	81,00	0,06 x10 ⁴	70,00
7	0	0	0,32 x10 ⁴	0	0,56 x10 ⁴	35,00	0,12 x10 ⁴	41,67
14	0	0	0,24 x10 ⁴	0	0,06 x10 ⁴	47,80	0,02 x10 ⁴	22,20
21	0	0	0,12 x10 ⁴	0	0,16 x10 ⁴	21,11	0,04 x10 ⁴	5,56
28	0	0	0,29 x10 ⁴	0	1,69 x10 ⁴	50,00	0,17 x10 ⁴	45,50

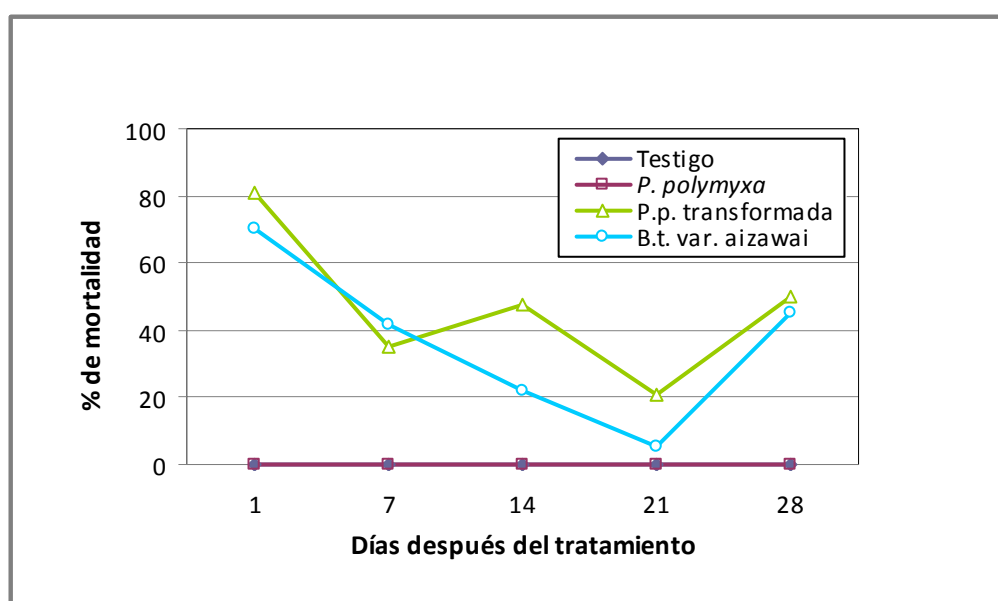


Figura 10. Comparación en condiciones de umbráculo de la persistencia de actividad insecticida de *Paenibacillus polymyxa* transformada, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*.

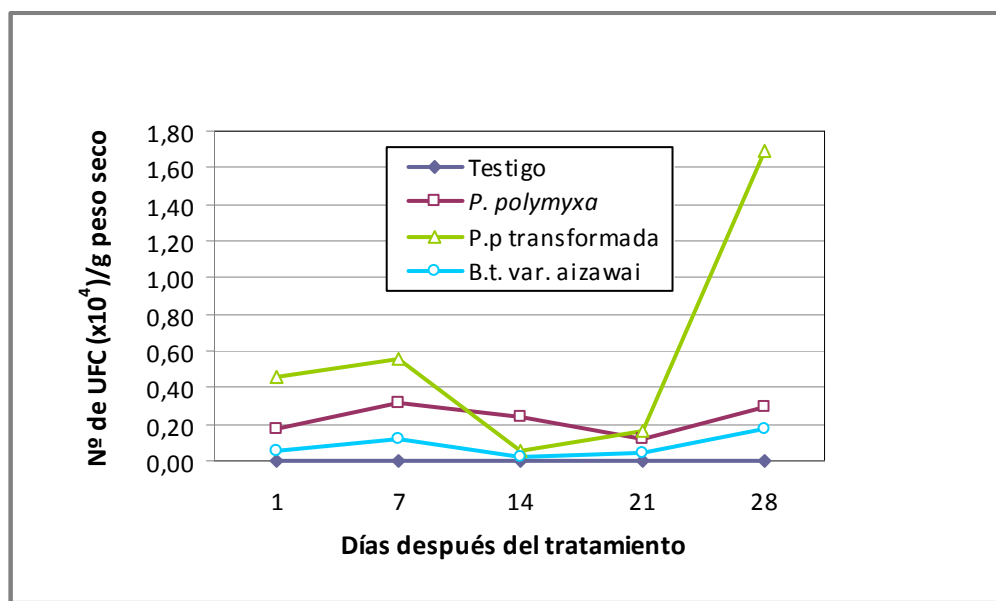


Figura 11. Comparación en condiciones de umbráculo de la supervivencia de *Paenibacillus polymyxa* transformada, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*.

4.2.3. En condiciones de invernadero

En la tabla 19 y figura 12, se muestra la evolución de la actividad insecticida de *P. polymyxa* no transformada, *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* en larvas de primer estadio de *S. littoralis* que han ingerido hojas de algodón tratadas en invernadero entre 1 y 28 días después del tratamiento. Los porcentajes de mortalidad oscilaron entre 3,33-86,7 y 12,22-72 % para *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* respectivamente, manteniendo ambos tratamientos actividad insecticida, si bien en las dos últimas semanas la mortalidad larvaria se reduce ligeramente. Los tratamientos Testigo y *P. polymyxa* no transformada, como era de esperar, no causaron mortalidad larvaria.

La persistencia de *P. polymyxa* no transformada, *P. polymyxa* transformada y *B.thuringiensis* var. *aizawai* en el interior de las hojas de algodón tratadas en invernadero se muestran la tabla 19 y figura 13. En las hojas superficialmente esterilizadas las bacterias sobrevivieron con niveles de población similares entre tratamientos y fechas, con la única diferencia de *P. polymyxa* transformada que mostró un crecimiento poblacional en las dos primeras semanas.

Tabla 19. Supervivencia y persistencia de la actividad insecticida del *Paenibacillus polymyxa* no transformada (Pp), *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) en hojas de algodón en invernadero.

Días	Testigo		Pp		Ppt		Btx	
	Supviv. UFC/g peso seco	% mort.	Supviv. UFC/g peso seco	% mort.	Supviv. UFC/g peso seco	% mort.	Supviv. UFC/g peso seco	% mort.
1	0	0	0,47x10 ⁴	0	0,60 x10 ⁴	32,00	0,29 x10 ⁴	26,00
7	0	0	0,14 x10 ⁴	0	1,03 x10 ⁴	78,00	0,06 x10 ⁴	72,00
14	0	0	0,17 x10 ⁴	0	1,33 x10 ⁴	86,00	0,26 x10 ⁴	18,00
21	0	0	0,61 x10 ⁴	0	0,35 x10 ⁴	3,33	0,02 x10 ⁴	31,10
28	0	0	0,26 x10 ⁴	0	0,73 x10 ⁴	26,67	0,02 x10 ⁴	12,22

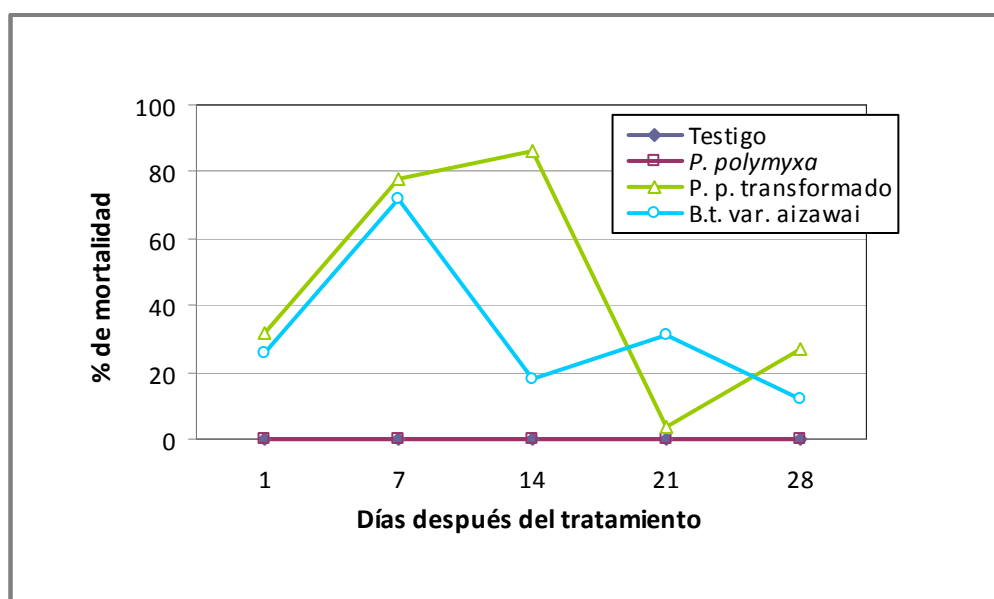


Figura 12. Comparación en condiciones de invernadero de la persistencia actividad insecticida de *Paenibacillus polymyxa* transformada, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*.

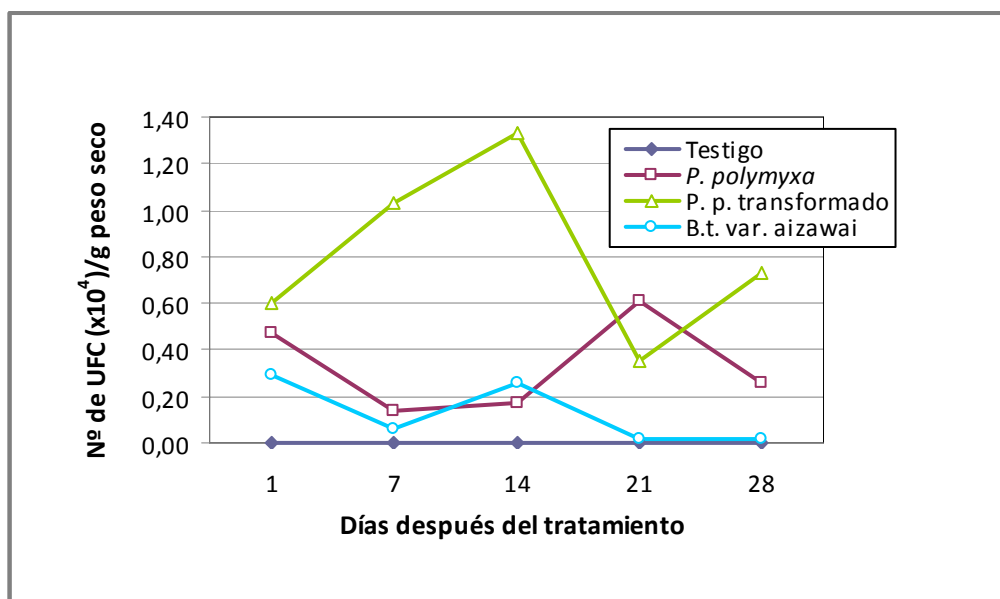


Figura 13. Comparación en condiciones de invernadero de la supervivencia de *Paenibacillus polymyxa* transformada, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*.

4.2.4. Detección de las bacterias en los tejidos foliares

4.2.4.1. Análisis de proteínas

En la figura 14 se muestran los perfiles proteínicos en SDS-PAGE de la bacteria *P. polymyxa* transformada, respecto de la no transformada (original) y de *B. thuringiensis* var. *aizawai*. La banda correspondiente a la toxina Cry1C (135 kD) se detecta sólo en las células esporuladas, tanto de *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Perfil 1) como de *P. polymyxa* transformada (Perfil 2).

En la figura 15 se comparan los perfiles proteínicos obtenidos en muestras hojas de algodón que fueron tratadas 14 días antes con *P. polymyxa* transformada y en hojas tratadas con *P. polymyxa*. Se puede observar la presencia de la banda correspondiente a Cry1C solamente en las hojas tratadas con *P. polymyxa* transformada (Ppt), que se corresponde con la banda obtenida a partir de Ppt en cultivo.

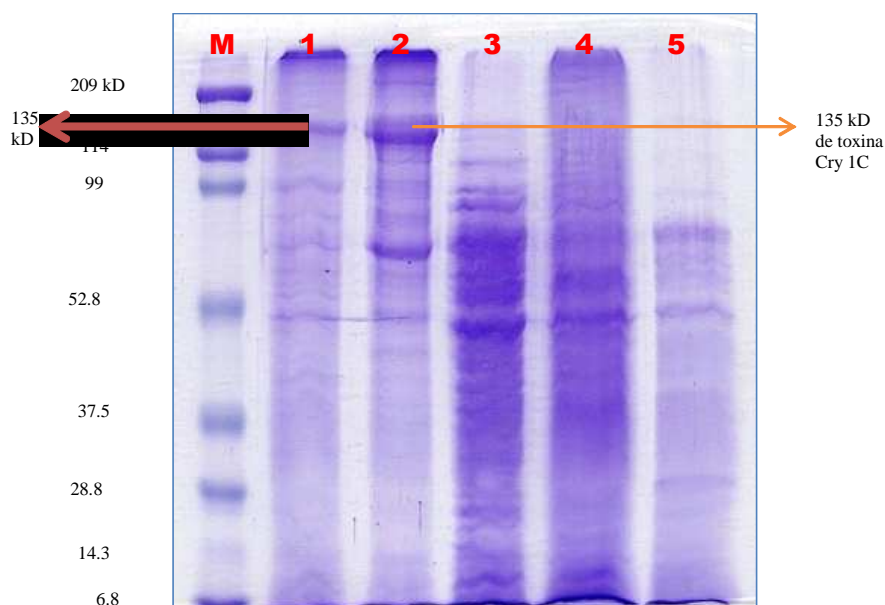


Figura 14. Perfiles de proteína en SDS-PAGE de la bacteria *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt), en comparación con *Paenibacillus polymyxa* (Pp) y con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx). M: marcador y sus bandas; 1: Btx esporulada, 2: Ppt esporulada; 3: Ppt célula vegetativa; 4: Pp esporulada; 5: Pp célula vegetativa.

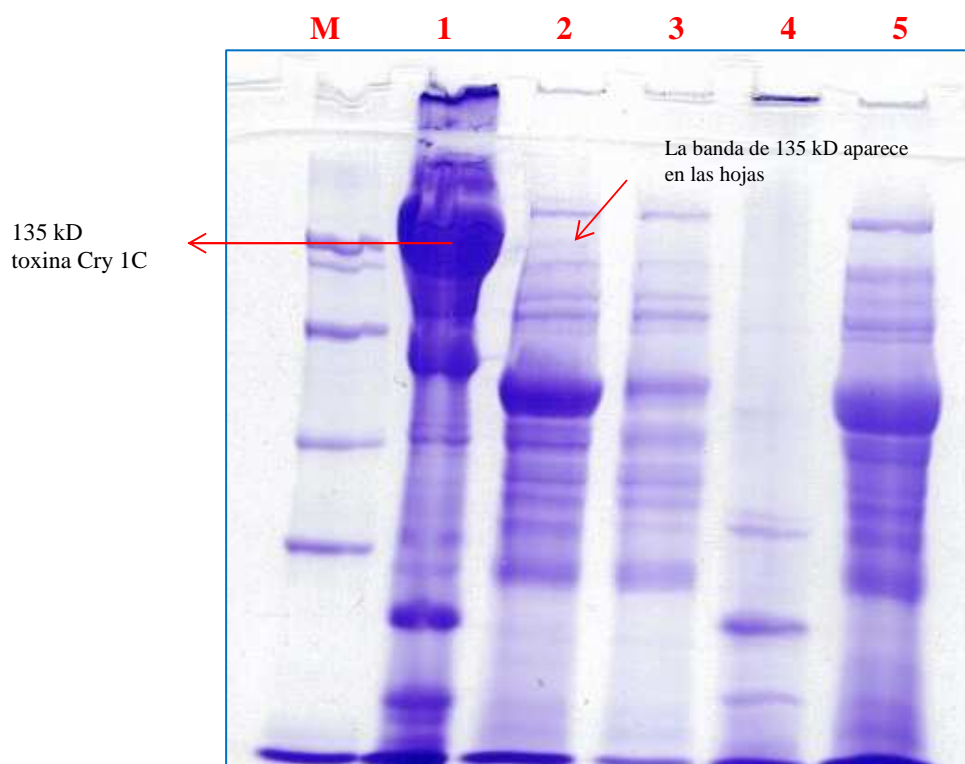


Figura 15. Perfiles de proteína en SDS-PAGE de hojas tratadas con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) en comparación con hojas tratadas con *Paenibacillus polymyxa* (Pp). 1: Ppt de cultivo; 2: hojas tratadas con Ppt; 3: hojas no tratadas (Control); 4: Pp; 5: hojas tratadas con Pp.

4.2.4.2 Análisis del *cry1C*

En las figuras 16 y 17 se muestran los perfiles en gel de agarosa de la PCR para la detección de *cry1C* en bacterias que fueron obtenidas a partir de muestras de hojas de algodón recogidas 2, 14 y 28 días después del tratamiento con *P. polymyxa* transformada, con *B. thuringiensis* var. *aizawai* y con *P. polymyxa* no transformada.

Los perfiles obtenidos usando la pareja de primers 1AF y 1AR (Figura 16) muestran la presencia de la banda correspondiente al gen *cry1C* (2200 pb) en las muestras de hojas recogidas 2 días y 28 días después del tratamiento con *P. polymyxa* transformada (la muestra de 14 días postratamiento no dio reacción con la polimerasa). También se detectaron las bandas correspondientes al gen *cry1C* en las muestras recogidas 2,14 y 28 días después del tratamiento con *B. thuringiensis* var. *aizawai*.

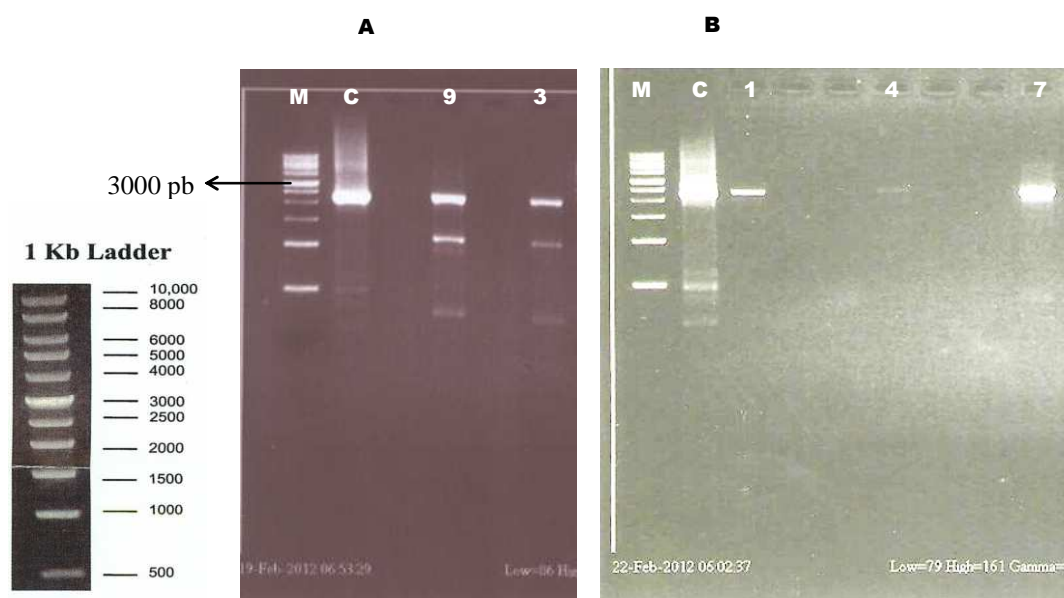


Figura 16. Perfiles de ADN en gel de agarosa de la PCR de 2,2 Kb de *cry 1C*, a partir de muestras de hojas tratadas con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) y con *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) usando los primers específicos 1AF y 1AR. M: Marcador de ADN; C: Control Positivo; 3 y 9: Ppt 2 días y 28 días después del tratamiento; 1, 4 y 7: Btx 28 días, 14 días y 2 días después del tratamiento.

Usando otra pareja de primers (1AF y 1CR) se confirma la detección del gen *cry1C* (3700 pb) en las muestras de hojas recogidas 2 días y 28 días después del tratamiento con *P. polymyxa* transformada (Figura 17).

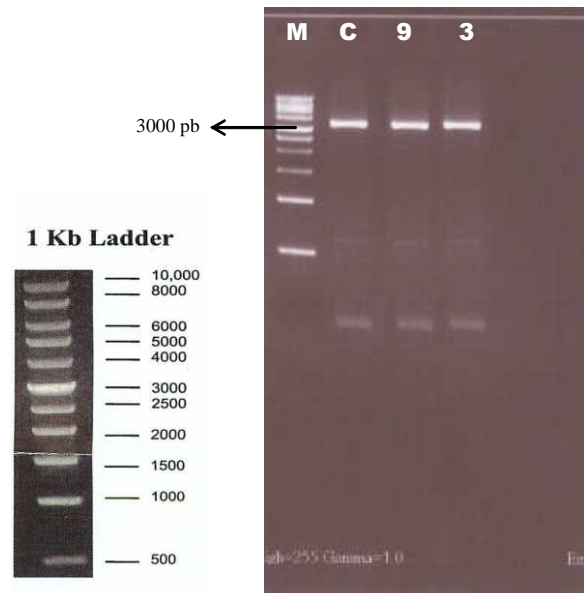


Figura 17. Perfiles de ADN en gel de agarosa de la PCR de 3,7 Kb de *cry1C*, a partir de muestras de hojas tratadas con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) usando los primers específicos 1AF & 1CR . M: Marcador de ADN; C: Control Positivo; 3 y 9: Ppt 2 días y 28 días después del tratamiento.

4.3. Selección de resistencia en poblaciones de *Spodoptera littoralis*

4.3.1. Susceptibilidad de las larvas en sucesivas generaciones de selección

Generación inicial

Las larvas neonatas de *S. littoralis* son tratadas con una serie de dosis para cada bacteria (*B. thuringiensis* var. *aizawai* y *P. polymyxa* transformada), mediante el método de inoculación antes descrito (ver apartado 3.4. de Materiales y Métodos).

En la tabla 1 se indican la mortalidad larvaria y en la tabla 2 el resultado del análisis de regresión Probit (ver apartado 4.1.1). Los valores de la prueba χ^2 indican un buen ajuste de ambas rectas, cuyas pendientes estuvieron cercanas a la unidad, aunque difirieron significativamente entre sí. La pendiente más baja correspondió a la recta referida al *P. polymyxa* transformada, indicando esto una mayor heterogeneidad en la respuesta de las larvas a esta bacteria.

Se repite este tratamiento con CL_{50} cada generación y en la generaciones 4, 8 y 12 se determina nuevamente la susceptibilidad de las larvas de *S. littoralis* para cada bacteria.

Cuarta generación

Con los datos de mortalidad larvaria (Tabla 20) se procede al análisis de regresión Probit. Las rectas de regresión estimadas para cada tratamiento tuvieron un buen ajuste, como se pone de manifiesto por la no significación de la prueba χ^2 y las pendientes no difirieron entre sí (Tabla 21). El valor de la CL_{50} para *B. thuringiensis* var. *aizawai* fue menor que para *P. polymyxa* transformada. Tras el nuevo ajuste de ambas rectas con la condición de paralelismo se obtiene que la potencia como insecticida de *P. polymyxa* transformada es de 0,53 en comparación con el valor 1 de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, aunque estas diferencias no difieren estadísticamente, como se deduce de los límites fiduciales de las potencias relativas (Tabla 22).

Tabla 20. Mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* tratadas en primer estadio con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) en la cuarta generación de selección para resistencia.

Tratamiento	Concentración (espora+crystal/ml)	Nº larvas tratadas	Nº larvas muertas	% Mortalidad
Btx	0,0	50	1	2
	6,16x10 ⁶	50	4	8
	18,47x10 ⁶	50	20	40
	55,40x10 ⁶	50	25	50
	166,20x10 ⁶	50	42	84
Ppt	0,0	100	0	0
	6,12x 10 ⁶	102	5	4,9
	18,40x 10 ⁶	101	23	22,8
	55,06x 10 ⁶	100	29	29
	165,30x10 ⁶	100	66	66
	495,90x10 ⁶	100	94	94

Tabla 21. Rectas de regresión Probit y CL₅₀ de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* de la cuarta generación de selección para resistencia.

Tratamiento	χ^2	gdl	Recta de regresión	CL ₅₀ (esp+cri/ml)	Límites fiduciales 95%	
					Inferior	Superior
Btx	4,24	2	y = 1,53x + 2,5	42,30 x10 ⁶	-----	-----
Ppt	11,38	3	y = 1,54x + 2,07	79,55 x10 ⁶	41,17x10 ⁶	171,17x10 ⁶

χ^2 = test para la bondad del ajuste

Tabla 22. Potencia relativa, rectas de regresión Probit y CL₅₀ de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* de la cuarta generación de selección para resistencia.

Tratamiento	Recta de regresión	CL ₅₀ (esp+cri/ml)	Potencia Relativa	Límites fiduciales 95%	
				Inferior	Superior
Btx	$y = 1,54x + 2,49$	$42,27 \times 10^6$	1	-----	-----
Ppt	$y = 1,54x + 2,07$	$79,57 \times 10^6$	0,53	0,25	1,12

Octava generación

La generación octava (Tabla 23) y, los resultados del análisis de regresión Probit se reflejan en la tabla 24. Según se desprende de las ecuaciones de regresión, que tuvieron un buen ajuste, la pendiente de la recta para *P. polymyxa* transformada fue mayor que para *B. thuringiensis* var. *aizawai*, con diferencias significativas. Sin embargo, los valores de CL₅₀ correspondientes a ambos tratamientos no difirieron significativamente entre sí.

Tabla 23. Mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* tratadas en primer estadio con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) en la octava generación de selección para resistencia.

Tratamiento	Concentración (espora+cristal/ml)	Nº larvas tratadas	Nº larvas muertas	%
				Mortalidad
Btx	0,0	120	0,0	0,0
	$18,47 \times 10^6$	120	27	22,5
	$55,40 \times 10^6$	124	45	36,3
	$166,20 \times 10^6$	124	72	58,1
	$498,60 \times 10^6$	40	34	85
Ppt	0,0	30	1	3
	$18,40 \times 10^6$	30	2	6,7
	$55,06 \times 10^6$	30	8	26,7
	$165,30 \times 10^6$	30	19	63,3

Tabla 24. Rectas de regresión Probit y CL₅₀ de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* en la octava generación de selección para resistencia.

Tratamiento	χ^2	gdl	Recta de regresión	CL ₅₀ (esp+cri/ml)	Límites fiduciales 95%	
					Inferior	Superior
Btx	1,90	2	$y = 1,13x + 2,75$	$98,69 \times 10^6$	$75,90 \times 10^6$	$134,17 \times 10^6$
Ppt	0,02	1	$y = 2,17x + 0,50$	$118,16 \times 10^6$	$79,40 \times 10^6$	$204,94 \times 10^6$

χ^2 = test para la bondad del ajuste

Duodécima generación

La generación duodécima (Tabla 25). Los resultados del análisis de regresión Probit se reflejan en la tabla 26. Al igual que en el caso anterior (generación 8) las rectas tuvieron un buen ajuste y la pendiente para *P. polymyxa* transformada fue significativamente mayor que para *B. thuringiensis* var. *aizawai*. En esta generación, sin embargo, el valor de CL₅₀ correspondiente a *P. polymyxa* transformada fue casi 4 veces más elevado que el de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, estando al límite de las diferencias significativas, como se deduce de los intervalos fiduciales.

Tabla 25. Mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* tratadas en primer estadio con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) en la duodécima generación de selección para resistencia.

Tratamiento	Concentración (espora+cristal/ml)	Nº larvas tratadas	Nº larvas muertas	% Mortalidad
Btx	0,0	39	1	2,60
	18,47x10 ⁶	40	7	17,50
	55,40x10 ⁶	40	20	50
	166,20x10 ⁶	40	24	60
	498,60x10 ⁶	40	27	67,50
	1495,80 x10 ⁶	40	38	95
Ppt	0,0	29	0,0	0,0
	165,3x 10 ⁶	30	3	10
	495,9x10 ⁶	30	20	66,70
	1487,7x 10 ⁶	30	29	96,70

Tabla 26. Rectas de regresión Probit y CL₅₀ de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* en la duodécima generación de selección para resistencia.

Tratamiento	χ^2	gdl	Recta de regresión	CL ₅₀ (esp+cri/ml)	Límites fiduciales 95%	
					Inferior	Superior
Btx	5,91	3	y = 1,11x + 2,77	104,02 x10 ⁶	17,75 x10 ⁶	309,66 x10 ⁶
Ppt	0,19	1	y = 3,34x - 3,63	385,29 x10 ⁶	298,59x10 ⁶	491,76x10 ⁶

χ^2 = test para la bondad del ajuste

4.3.2. Evolución de la susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* en sucesivas generaciones de selección para resistencia.

En la tabla 27 y figura 18 se comparan de las rectas de regresión Probit y CL_{50} de *B. thuringiensis* var. *aizawai* en larvas de primer estadio de *S. littoralis* para todas la generaciones. En la tabla 28 se indican las nuevas rectas regresión con la condición de paralelismo, las respectivas CL_{50} y las potencias relativas e las sucesivas generaciones de selección de resistencia a *B. thuringiensis* var. *aizawai*. Las pendientes de las rectas oscilaron entre 1,06 de la generación inicial y 1,53 de la 4ª generación, sin que se encontrasen diferencias significativas entre las sucesivas generaciones de selección. Igualmente las CL_{50} no mostraron cambios estadísticamente significativos, situándose en valores comprendidos entre $4,23 \times 10^7$ y $10,4 \times 10^7$ esp+cri/ml. Tampoco se encontraron diferencias entre las respectivas potencias relativas (Tabla 28).

Tabla 27. Rectas de regresión Probit y CL_{50} de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* en sucesivas generaciones de selección para resistencia.

Generación	χ^2	gdl	Recta de regresión	CL_{50} (esp+cri/ml)	Límites fiduciales 95%	
					Inferior	Superior
Inicial	9,46	4	$y = 1,06x + 2,96$	$84,71 \times 10^6$	$45,02 \times 10^6$	$240,09 \times 10^6$
4	4,24	2	$y = 1,53x + 2,5$	$42,30 \times 10^6$	-----	-----
8	1,90	2	$y = 1,13x + 2,75$	$98,69 \times 10^6$	$75,90 \times 10^6$	$134,17 \times 10^6$
12	5,91	3	$y = 1,11x + 2,77$	$104,02 \times 10^6$	$17,75 \times 10^6$	$309,66 \times 10^6$

χ^2 = test para la bondad del ajuste

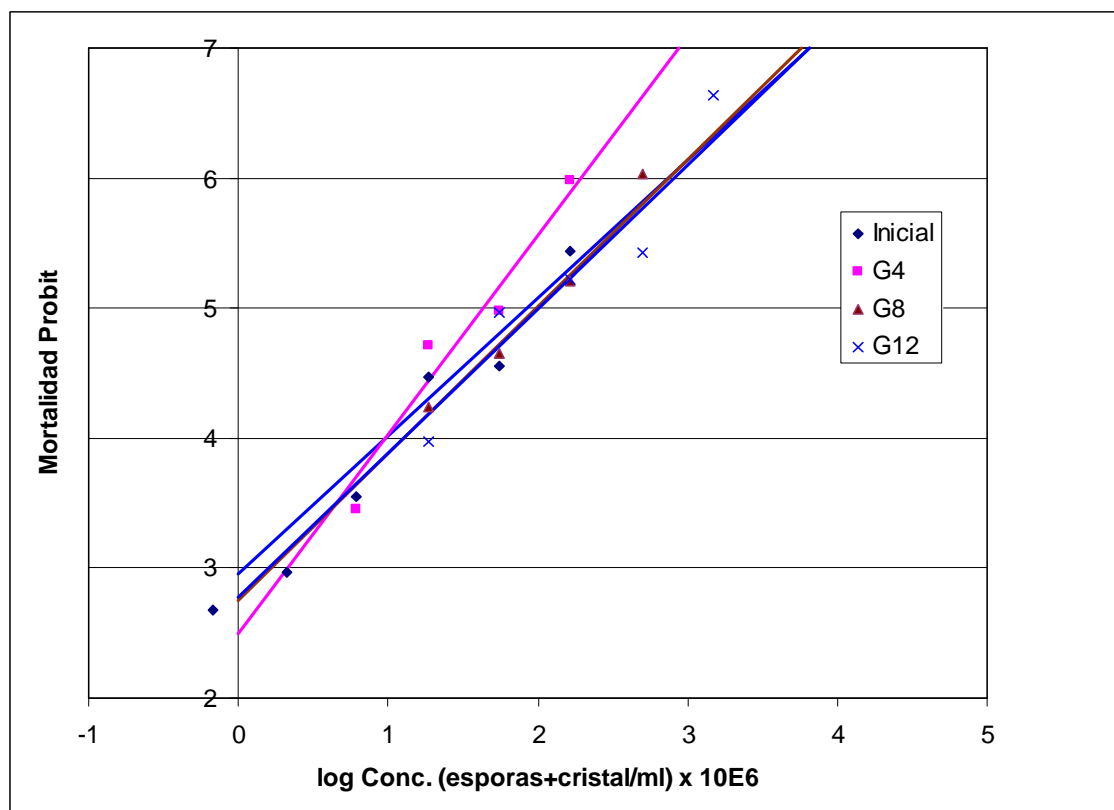


Figura 18. Representación gráfica de las rectas de regresión Probit de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* en sucesivas generaciones de selección para resistencia.

Tabla 28. Potencias relativa, rectas de regresión Probit y CL_{50} de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* en sucesivas generaciones de selección para resistencia.

Tratamiento	Recta de regresión	CL_{50} (esp+cri/ml)	Potencia Relativa	Límites fiduciales 95%	
				Inferior	Superior
Inicial	$y = 1,14x + 2,85$	$78,20 \times 10^6$	1	-	-
4	$y = 1,14x + 3,13$	$44,54 \times 10^6$	1,76	0,88	3,68
8	$y = 1,14x + 2,73$	$99,10 \times 10^6$	0,79	0,46	1,42
12	$y = 1,14x + 2,70$	$104,98 \times 10^6$	0,74	0,36	1,66

4.3.3. Evolución de la susceptibilidad a *Paenibacillus polymyxa* transformada en sucesivas generaciones de selección para resistencia.

En la tabla 29 y figura 19 se reflejan las rectas de regresión Probit y CL₅₀ en las sucesivas generaciones de resistencia a *P. polymyxa* transformada. Los valores de las pendientes de las rectas estimadas muestran un incremento significativo en las generaciones 8 y 12, respecto de la inicial y de la generación 4. Además, las CL₅₀ fueron progresivamente aumentando su valor hasta la generación 12 que presentó una CL₅₀ de $3,9 \times 10^8$ esp+cri/ml, significativamente diferente a las CL₅₀ obtenidas en las anteriores generaciones. El factor de resistencia obtenido, respecto a la generación inicial, fue de 5,47.

Tabla 29. Rectas de regresión Probit y CL₅₀ de *Paenibacillus polymyxa* transformada en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* en sucesivas generaciones de selección para resistencia.

Generación	χ^2	gdl	Recta de regresión	CL ₅₀ (esp+cri/ml)	Límites fiduciales 95%	
					Inferior	Superior
Inicial	1,28	3	$y = 1,83x + 1,62$	$70,38 \times 10^6$	$54,86 \times 10^6$	$90,90 \times 10^6$
4	11,38	3	$y = 1,54x + 2,07$	$79,55 \times 10^6$	$41,17 \times 10^6$	$171,17 \times 10^6$
8	0,02	1	$y = 2,17x + 0,50$	$118,16 \times 10^6$	$79,40 \times 10^6$	$204,94 \times 10^6$
12	0,19	1	$y = 3,34x - 3,63$	$385,29 \times 10^6$	$298,59 \times 10^6$	$491,76 \times 10^6$

χ^2 = test para la bondad del ajuste

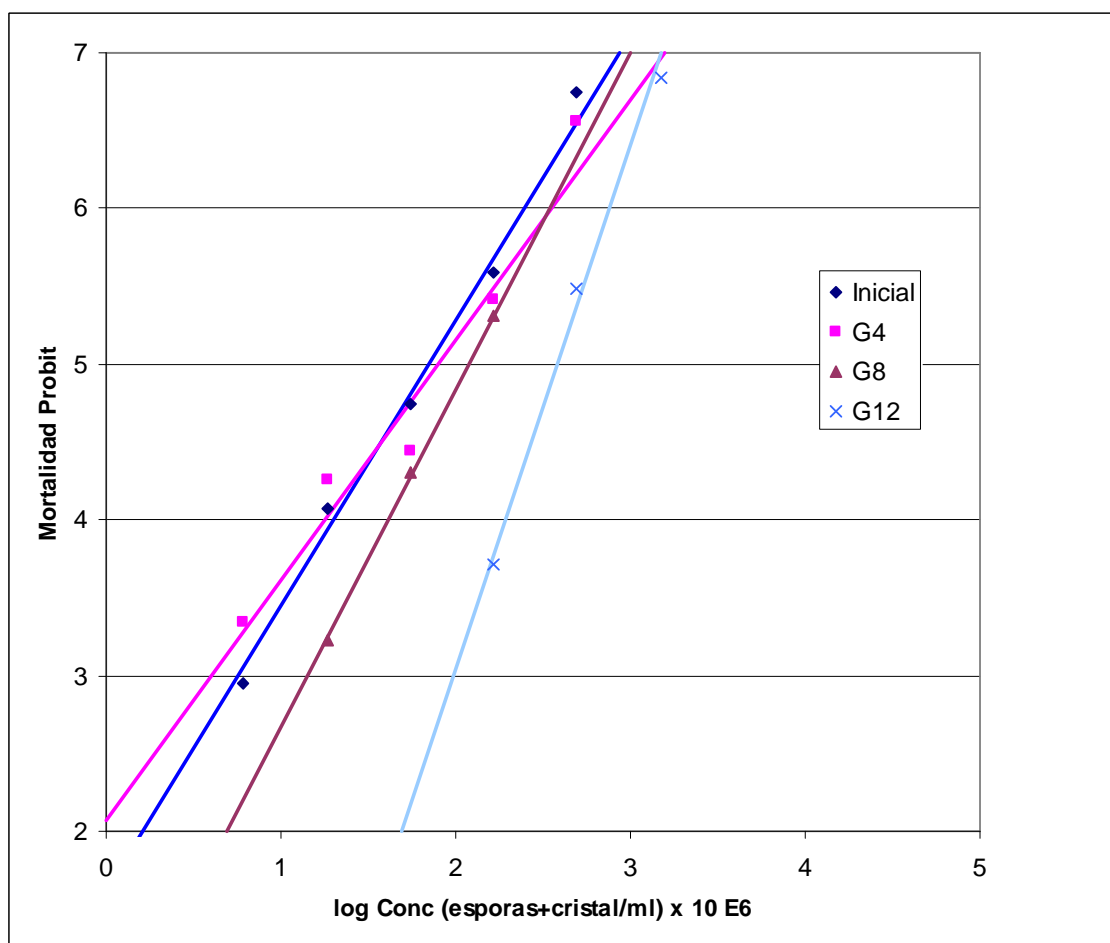


Figura 19. Representación gráfica de las rectas de regresión Probit *Paenibacillus polymyxa* transformada en larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* en sucesivas generaciones de selección para resistencia.

4.3.4. Potencial biológico de las poblaciones seleccionadas

Desarrollo de estados inmaduros

En la tabla 30 se muestra el tiempo de desarrollo larvario, de la población de selección de resistencia a *B. thuringiensis* var. *aizawai* y de la seleccionada con *P. polymyxa* transformada así como de una población no seleccionada (Testigo). En el caso de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, el valor medio para las hembras (20,86 días) no difirió significativamente del testigo; por el contrario, el valor medio para los machos (20,25 días) fue significativamente menor ($p < 0,0001$) que en la población no seleccionada, con una diferencia de casi un día y medio.

En la población de selección de resistencia a *P. polymyxa* transformada, el valor medio para las larvas de las hembras tratadas (22,03 días) fue significativamente mayor ($p=0,0006$) que para el testigo, mientras que el desarrollo de los machos (22,33 días) aunque mayor que en el testigo no difirió significativamente

El tiempo de desarrollo larvario de la población seleccionada con *B. thuringiensis* var. *aizawai* fue significativamente inferior que la seleccionada con *P. polymyxa* transformada, tanto en los machos ($p<0,0001$) como en las hembras ($p=0,0006$).

Tabla 30. Periodo de desarrollo de larvas de *Spodoptera littoralis* de las poblaciones seleccionadas con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Sexo	Población	N°	Tiempo (días)		
			Media	Intervalo	SE
♀	Testigo	22	21,05 a	19-24	0,37
	Btx	50	20,86 a	19-25	0,24
	Ppt	77	22,03 b	19-27	0,20
♂	Testigo	46	21,74 a	19-24	0,26
	Btx	59	20,25 b	19-29	0,23
	Ppt	49	22,33 a	20-26	0,25

SE = Error estándar de la media.

Medias seguidas de la misma letra, para cada sexo, indica que no difieren significativamente al 95%

Según se observa en la tabla 31, el periodo de pupación de los machos fue alrededor de dos días mayor al de hembras. La población seleccionada con *B. thuringiensis* var. *aizawai* disminuyó significativamente el periodo de pupación tanto en las hembras como en los machos ($p<0,0001$) respecto de las otras dos poblaciones. Pero en la población seleccionada con *P. polymyxa* transformada se disminuyó significativamente el periodo de pupación de las hembras ($p<0,0001$).

Tabla 31. Periodo de pupación de *Spodoptera littoralis* de las poblaciones seleccionadas con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Sexo	Población	N	Tiempo (días)	
			Media	SE
♀	Testigo	22	15,14 a	0,28
	Btx	50	13,18 c	0,19
	Ppt	77	14,49 b	0,15
♂	Testigo	46	16,43 a	0,17
	Btx	59	14,66 b	0,15
	Ppt	49	16,31 a	0,17

Medias seguidas de la misma letra, para cada sexo, indica que no difieren significativamente al 95%

En la tabla 32 se muestra el peso de las pupas de cada una de las poblaciones. En las seleccionadas con *B. thuringiensis* var. *aizawai* y con *P. polymyxa* transformada el peso fue significativamente mayor que en el testigo ($p < 0,0004$), siendo en la seleccionada con *P. polymyxa* transformada donde se alcanzaron los mayores pesos de las pupas.

Tabla 32. Peso de pupas de *Spodoptera littoralis* de las poblaciones seleccionadas con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Sexo	Población	N	Peso (gr)	
			Media	SE
♀	Testigo	22	0,32 a	0,011
	Btx	50	0,36 b	0,0072
	Ppt	77	0,37 b	0,0058
♂	Testigo	46	0,27 a	0,0065
	Btx	59	0,32 b	0,0058
	Ppt	49	0,34 c	0,0063

Medias seguidas de la misma letra, para cada sexo, indica que no difieren significativamente al 95%

Reproducción

Como se observa en la tabla 33, en las tres poblaciones estudiadas, todas las parejas que formaban parte del ensayo copularon, todas las hembras fueron fecundas y pusieron huevos fértiles del testigo.

Tabla 33. Respuesta de las hembras de *Spodoptera littoralis* de las poblaciones seleccionadas con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Población	N	N° HEMBRAS		
		Copuladas	Fecundas	Fértiles
♀ x ♂	18	18	18	18
♀ Btx x ♂ Btx	16	16	16	16
♀ Ppt x ♂ Ppt	22	22	22	22

N = Número de parejas

Se estudiaron dos índices que sirven para estimar el potencial de incremento poblacional en la siguiente generación: el número de huevos puestos por hembra y el porcentaje de viabilidad de éstos. Además se determinó el número medio de espermatozoides por hembra, lo que representa una medida del número de copulaciones de las hembras durante toda su vida. Los valores obtenidos se reflejan en la tabla 34.

Tabla 34. Potencial reproductor de *Spodoptera littoralis* de las poblaciones seleccionadas con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Población	N	N° HUEVOS / ♀		% VIABILIDAD		N° ESPF., /♀
		Media	Intervalo	Media	Intervalo	
♀ x ♂	18	855,30 a	270-1325	40,60 a	1,96-77,78	1,44 a
♀ Btx x ♂ Btx	16	803,10 a	250-1550	9,09 b	1,74-20,00	1,50 a
♀ Ppt x ♂ Ppt	22	1177,3 b	300-1800	14,91 b	2,78-30,34	1,50 a

N=Número de parejas.

Medias seguidas de la misma letra en cada columna indican que no difieren significativamente al 95%

La fecundidad media en la población testigo fue de 855,30 huevos/hembra. El valor medio más bajo lo obtuvo en la población seleccionada con *B. thuringiensis* var. *aizawai*, sin diferencias significativas con el testigo. El valor medio más alto lo se obtuvo en la población seleccionada con *P. polymyxa* transformada difiriendo significativamente ($p=0.003$) con la población seleccionada a *B. thuringiensis* var. *aizawai*.

En cuanto al porcentaje de viabilidad de huevos, se encontraran diferencias significativas entre las poblaciones ($p<0,0001$). Se detectó un descenso acusado en el porcentaje de viabilidad de huevos en las dos poblaciones seleccionadas, respecto de la población testigo.

No hubo diferencias significativas en el número medio de espermatozoides presentes en la hembra entre las poblaciones estudiadas. En general las hembras copularon una vez durante su vida, aunque algunas tuvieron dos copulaciones.

Para cada población se han estudiado también los períodos de preoviposición (tiempo transcurrido desde la emergencia de la hembra hasta el inicio de puesta), días de oviposición y días de puesta viable (Tabla 35). No hubo diferencias significativas en el número de días de preoviposición y número de días de puesta en la población seleccionada con *B. thuringiensis* var. *aizawai* y la seleccionada con *P. polymyxa* transformada con respecto del testigo, mientras que sí hubo diferencias entre ambas poblaciones ($p=0.0223$; $p=0,0010$ para cada parámetro, respectivamente). En el número de días de puestas viables hubo una disminución significativa ($p<0,0007$) en la población seleccionada con *B. thuringiensis* var. *aizawai*.

Tabla 35. Periodos de puestas de *Spodoptera littoralis* de las poblaciones seleccionadas con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

Población	N	N° DÍAS DE		N° DÍAS DE		n	N° DE PUESTAS	
		PREOVIPOSICIÓN		PUESTA			VIABLES	
		Media	Intervalo	Media	Intervalo		Media	Intervalo
♀ x ♂	18	2,72 ab	1-5	2,95 ab	1-4	18	2,26 a	1-4
♀ _{Btx} X ♂ _{Btx}	16	3,75 b	2-9	2,79 b	2-3	16	0,71 b	1-2
♀ _{Ppt} X ♂ _{Ppt}	22	2,32 a	1-4	2,89 a	1-5	22	1,32 a	1-4

N=Número de hembras fecundas; n=Número de hembras con puestas viable.

Medias seguidas de la misma letra en cada columna indican que no difieren significativamente al 95%

En la tabla 36 se refleja la longevidad de machos y hembras en cada una de las poblaciones. Se obtienen diferencias significativas ($p=0.0292$) en las longevidades medias de los machos de la población seleccionada con *P. polymyxa* transformada y el testigo. La longevidad de las hembras también fue mayor que en el testigo aunque la diferencia no alcanzó nivel de significación ($p=0.0539$).

Tabla 36. Longevidad (en días) de machos y de hembras de *Spodoptera littoralis* de las poblaciones seleccionadas de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Btx) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

COMBINACIÓN	N	MACHOS		HEMBRAS	
		Media	Intervalo	Media	Intervalo
♀ X ♂	18	10,00 a	7-14	8,22 ab	3-13
♀ _{Btx} X ♂ _{Btx}	16	10,78 ab	8-15	8,00 b	6-9
♀ _{Ppt} X ♂ _{Ppt}	22	12,18 b	7-15	9,50 a	7-15

N=Número de parejas.

Medias seguidas de la misma letra en cada columna indican que no difieren significativamente al 95%

4.4. Influencia en la planta de *Paenibacillus polymyxa* natural y transformada

4.4.1. Contenido y fijación de Nitrógeno

El contenido de Nitrógeno en las plantas de algodón se muestra en la tabla 37 y figura 20. En las plantas tratadas con el *P. polymyxa* transformada el contenido medio de Nitrógeno fue de 52,93 mg/planta, significativamente mayor ($p=0.0005$) que el de 28,79 mg en las tratadas con *P. polymyxa* no transformada, y ambos tratamientos difirieron significativamente del testigo.

Tabla 37. Porcentaje y contenido total de Nitrógeno en planta de algodón tratadas con *Paenibacillus polymyxa* no transformada y *Paenibacillus polymyxa* transformada.

Tratamiento	% N			Contenido Total de N (mg/planta)			Media
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	
Testigo	1,39	1,59	1,49	11,54	13,2	12,37	12,37 a
<i>P. polymyxa</i>	1,79	2,19	2,19	25,06	30,66	30,66	28,79 b
<i>P. polymyxa</i> transformada	2,88	2,98	2,08	57,60	59,60	41,60	52,93 c

Medias seguidas por la misma letra indican que no difieren significativamente al 95%

La tabla 38 y figura 21 se muestran diferencias significativas entre tratamientos en la actividad nitrogenasa en suelo, de tal forma que en suelos con *P. polymyxa* transformada fue mayor ($p<0.0001$) que en suelos con el *P. polymyxa* no transformada y ambos tratamientos difirieron del testigo.

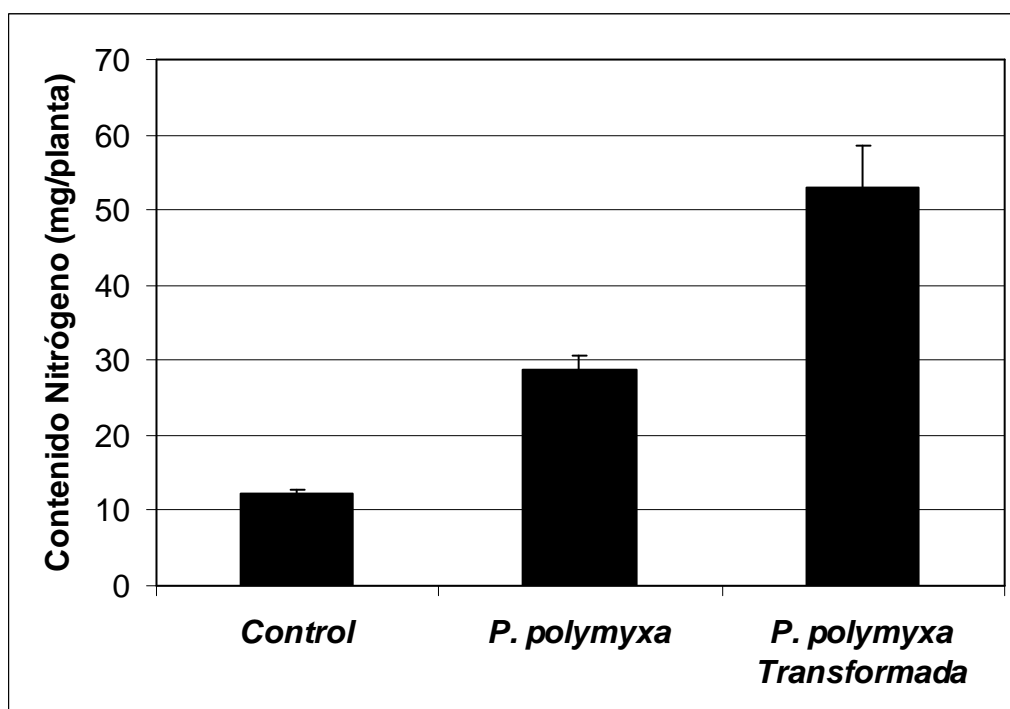


Figura 20. Contenido total de Nitrógeno en plantas de algodón tratadas con *Paenibacillus polymyxa* no transformada y con *Paenibacillus polymyxa* transformada.

Tabla 38. Actividad nitrogenasa en suelo tratado con *Paenibacillus polymyxa* no transformada y *Paenibacillus polymyxa* transformada.

Tratamiento	ARA (nmoles de etileno/gr/hr)			Media
	R ₁	R ₂	R ₃	
Testigo	64,49	91,93	43,10	66,51 a
<i>P. polymyxa</i>	266,61	288,12	346,30	300,34 b
<i>P. polymyxa</i> transformada	399,19	345,99	366,00	370,39 c

Medias seguidas por la misma letra indican que no difieren significativamente al 95%

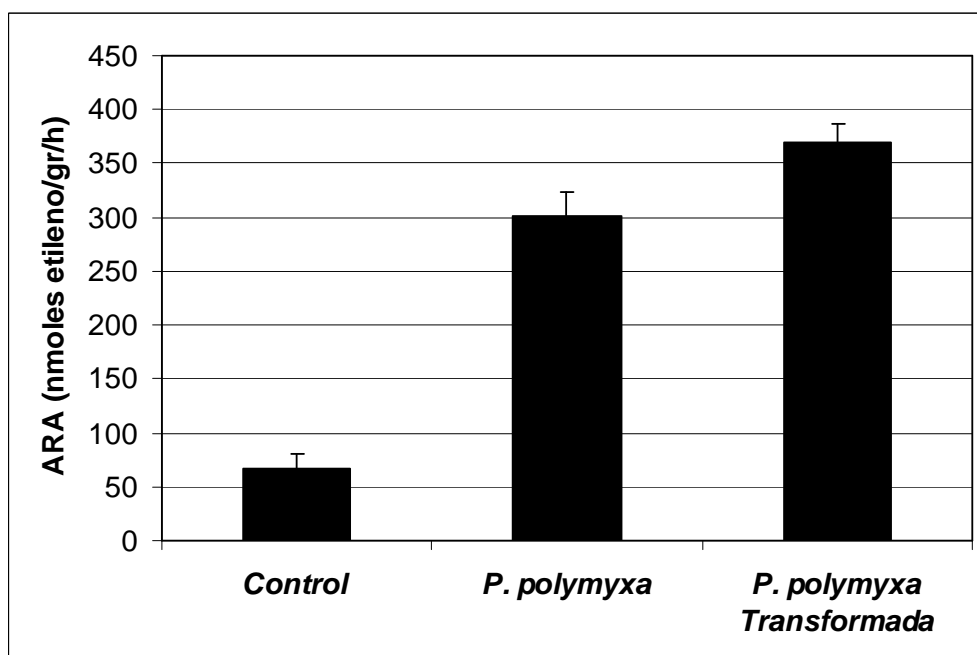


Figura 21. Actividad nitrogenasa en suelo tratado con *Paenibacillus polymyxa* no transformada y *Paenibacillus polymyxa* transformada.

4.4.2. Niveles de clorofila y carotenoides

En la figura 22 se indican los valores de la clorofila A, durante cuatro semanas, en plantas de algodón tratadas con *P. polymyxa* no transformada y con *P. polymyxa* transformada. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) y entre semanas ($p < 0.0001$). La cantidad de clorofila A fue mayor que el testigo hasta la segunda semana después del tratamiento con *P. polymyxa* transformada y hasta la tercera semana con *P. polymyxa* no transformada. Finalmente, en la cuarta semana los valores se redujeron situándose por debajo del nivel inicial.

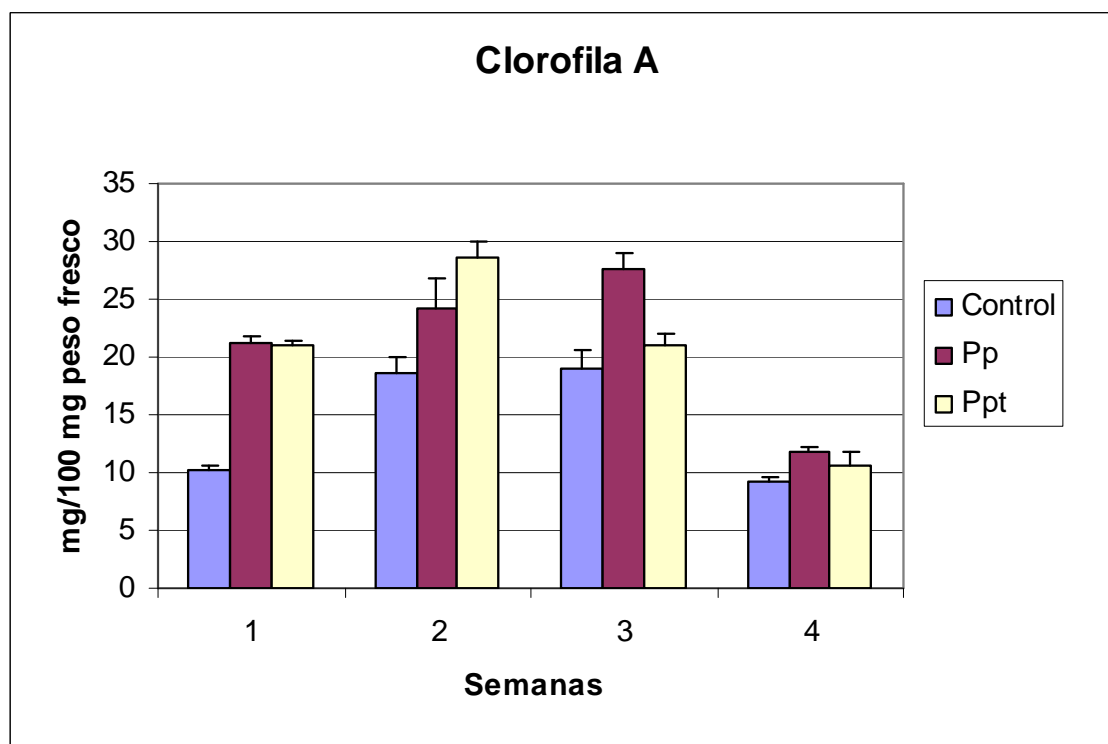


Figura 22. Niveles de la clorofila A durante los cuatros semanas en plantas de algodón tratadas con *Paenibacillus polymyxa* no transformada (Pp) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

En la figura 23 se indican los valores de la clorofila B, durante cuatros semanas, en plantas de algodón tratadas con *P. polymyxa* no transformada y con *P. polymyxa* transformada. Los valores de la clorofila B difirieron significativamente entre tratamientos ($p < 0.0001$) y entre semanas ($p < 0.0001$). A partir de la primera semana el contenido clorofila B fue mayor en ambos tratamientos respecto del testigo. En la segunda semana aumentaron significativamente los valores de clorofila B, tanto en las plantas tratadas con *P. polymyxa* transformada como en las tratadas con *P. polymyxa* no transformada. En la tercera semana se obtuvo un descenso significativo sólo en las tratadas con *P. polymyxa* transformada, recuperándose en la cuarta semana.

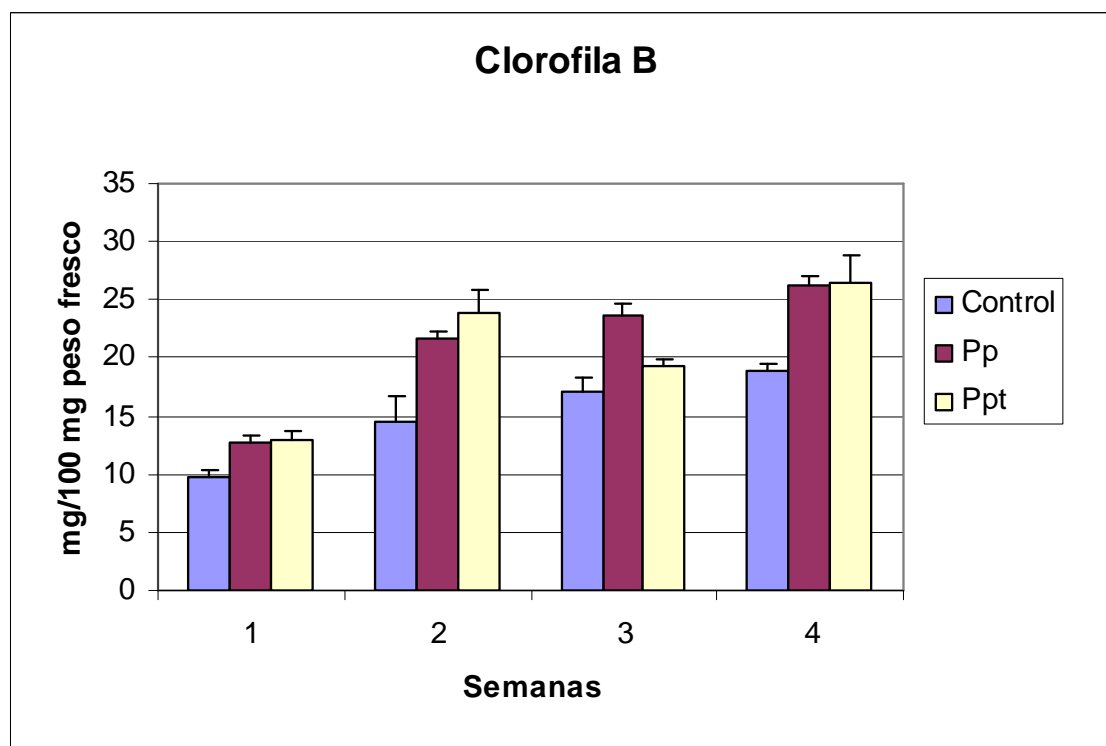


Figura 23. Los niveles de la clorofila B durante los cuatros semanas en planta de algodón tratadas con *Paenibacillus polymyxa* no transformada (Pp) y con *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

En la figura 24 se indican los niveles de clorofila A+B durante los cuatros semanas en plantas de algodón tratadas con *P. polymyxa* no transformada y con *P. polymyxa* transformada. Los valores difirieron entre tratamientos ($p < 0.0001$) y entre semanas ($p < 0.0001$). La pauta en la variación del contenido fue similar a la indicada para el contenido en clorofila A.

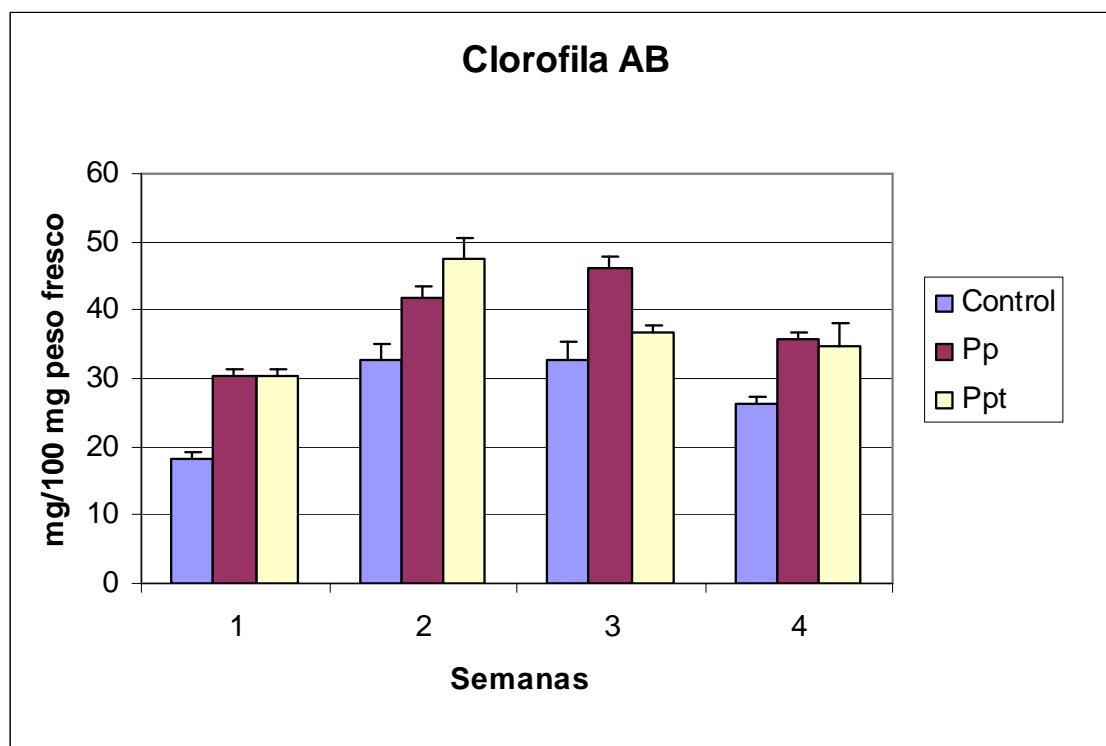


Figura 24. Los niveles de la clorofila A+B durante los cuatros semanas en planta de algodón tratadas con *Paenibacillus polymyxa* no transformada (Pp) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

En la figura 25 se indican los valores de los carotenoides, durante cuatros semanas, en plantas de algodón tratadas con *P. polymyxa* no transformada y *P. polymyxa* transformada. El análisis estadístico detectó diferencias significativas entre tratamiento ($p < 0.0001$). Desde la primera semana los valores en las plantas tratadas con *P. polymyxa* fueron superiores a las del testigo. En general, los valores fueron creciendo en el transcurso de las cuatro semanas, con incremento significativo en la segunda semana respecto a la primera en todos los tratamientos. Como en los resultados obtenidos con la clorofila B, la cantidad de carotenoides se redujo significativamente en la tercera semana solo para el tratamiento con *P. polymyxa* transformada, para recuperar sus niveles en la cuarta semana.

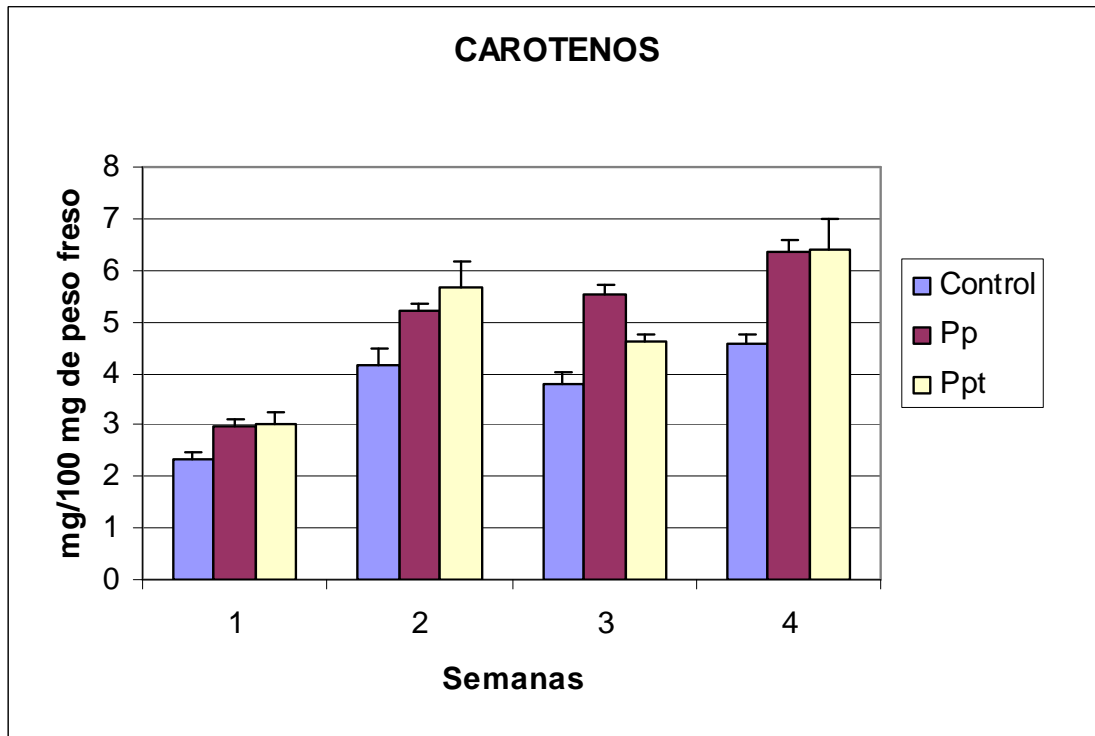


Figura 25. Los niveles de los carotenoides durante los cuatro semanas en planta de algodón tratadas con *Paenibacillus polymyxa* no transformada (Pp) y *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt).

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. Actividad insecticida

Los insecticidas biológicos disponibles para el control de las plagas de *S. littoralis* se basan, casi exclusivamente, en biopreparados que usan como materia activa el complejo espora-cristal de *B. thuringiensis* de las serovariedades *kurstaki* o *aizawai*. La toxina Cry1Ac de la primera subespecie es altamente tóxica para lepidópteros como *Heliothis virescens*, *Trichoplusia ni*, *Pieris brassicae*, *Ostrinia nubilalis* (Lereclus *et al.*, 1993), *Helicoverpa armigera* (Babu *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2004; Jalali *et al.*, 2004) y *Earias insulana* (Ramos *et al.*, 2004), pero es mucho menos tóxica para las larvas del género *Spodoptera* (Lereclus *et al.*, 1993; Navon, 1993; Hatem, 2006).

Para el control de poblaciones larvarias de *S. littoralis* es preferible la utilización de cepas que produzcan la toxina Cry1C, como es el caso de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, que es altamente tóxica para especies del género *Spodoptera* (*S. littoralis*, *S. exigua* y *S. frugiperda*) (Luo *et al.*, 1999; Sondas *et al.*, 2000), además de para otras especies de lepidópteros (Van Frankenhuyzen, 1993).

Nuestros resultados indican que la larvas de *S. littoralis*, procedentes de poblaciones autóctonas presentes en el Sur de España, son susceptibles a la mezcla de cristales y esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, que contiene de forma natural la toxina Cry1C. Por otro lado, la bacteria *P. polymyxa* transformada, a la que se le ha incorporado el gen cry 1C, se mostró también activa para las larvas de esta especie. Las líneas base (rectas de regresión Probit) de ambas cepas estudiadas difirieron en la pendiente, siendo significativamente menor la de *P. polymyxa* transformada, lo que se interpreta como una mayor heterogeneidad en la respuesta de las larvas al efecto tóxico de esta bacteria.

La actividad insecticida *P. polymyxa* transformada se caracterizó por una CL₅₀ para larvas de primer estadio de $7,04 \times 10^7$ espora+cristal/ml, ligeramente inferior a la obtenida por la cepa natural *B. thuringiensis* var. *aizawai* ($8,47 \times 10^7$ espora+cristal/ml), resultados que coinciden con los obtenidos con esta misma bacteria (Ibrahim *et al.*, 2006) y con una cepa bacteriana aislada de la rizosfera del algodón (Ibrahim y Omar, 2009). al compararlas con *B. thuringiensis* var. *entomocidus*.

Diferentes autores han obtenido bacterias genéticamente modificadas que incorporan genes *cry* en especies del género *Bacillus* presentes en el filoplano, como el gen *cry1Ab* en *B. subtilis* y *B. licheniformis* que colonizan plantas de tomate (Theoduloz *et al.*, 2003) o el gen

cry1Aa en *B. megaterium* presente en el filoplano del algodón (Bora *et al.*, 1994). Estas bacterias transformadas causan porcentajes de mortalidad, en larvas de *Tuta absoluta* y de *H. armigera* similares a los obtenidos con las cepas naturales de *B. thuringiensis*.

Para valorar adecuadamente el potencial de un producto insecticida como agente de control de plagas es necesario estudiar no sólo la mortalidad producida en la población tratada, sino también una serie de efectos que se manifiestan a más largo plazo en los individuos supervivientes al tratamiento. Estos efectos cobran un especial interés en especies polivoltinas, como *S. littoralis*, pues los efectos subletales del tratamiento sobre una generación tendrán consecuencias apreciables y directas en los niveles de población de las siguientes generaciones.

El periodo de desarrollo larvario de *S. littoralis* aumentó significativamente tras el tratamiento con *B. thuringiensis* var. *aizawai* así como con *P. polymyxa* transformada. Incrementos de desarrollo larvario han sido también señalados en tratamientos con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* en esta misma especie (González *et al.*, 2001; Abdalah y Abul-Nasr 1970; Salama *et al.*, 1981; Gujar *et al.*, 2001) y en otros lepidópteros de importancia agrícola, tales como *S. frugiperda*, *Pseudoplusia includens* (Nyoki *et al.*, 1996) y *Pieris rapae* (Soliman *et al.*, 1970). Se sabe que insectos tratados con *B. thuringiensis* presentan inhibición de alimentación que pueden no causar la muerte pero originar retraso en el crecimiento y desarrollo larvario, como por ejemplo ocurre en poblaciones larvarias de *Choristoneura fumiferana* tratadas con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Moreau y Bauce, 2001).

Por lo expuesto anteriormente, este efecto parece ser común a diferentes cepas de *B. thuringiensis* y, además, el hecho de que se haya presentado tanto en *B. thuringiensis* var. *aizawai* como en *P. polymyxa* transformada, hace suponer que esté relacionado con el modo de acción general de las proteínas Cry en el mesenterón. Las larvas que sobreviven a la ingestión de δ -endotoxinas sufren un deterioro de las células columnares sin efectos letales para el insecto probablemente en virtud de la alta capacidad del mesenterón para la reposición de las células dañadas (Loeb, 2010). La regeneración del mesenterón ha sido demostrada primeramente en cultivos *in vitro* (Loeb *et al.*, 2001) y se han detectado factores procedentes de las células maduras muertas que son responsables de estimular la división y diferenciación de las células regenerativas. Algunas de estas sustancias, como aril-forinas, han sido detectadas recientemente en respuesta a la acción directa causada por toxinas Cry (Castagnola, 2011). Es posible que en muchos casos este mecanismo de regeneración no logre la completa recuperación del tejido y esto afecte adversamente al apetito o a la capacidad de asimilación del alimento ingerido por las larvas, por lo que éstas se desarrollarán más

lentamente necesitando más tiempo hasta alcanzar el peso necesario para su transformación a pupa.

Una diferencia importante a hacer notar es que el periodo de desarrollo larvario de las larvas supervivientes al tratamiento con *P. polymyxa* transformada se prolongó alrededor de 3 días, mientras que el de larvas tratadas con *B. thuringiensis* var. *aizawai* lo hizo en casi 6 días. Nosotros pensamos que esta diferencia debe estar relacionada con el efecto causado por la ingestión, en el primer caso, de una sola toxina (Cry1C) frente al efecto conjunto de las diferentes toxinas (1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca, 1Da) que componen el cristal de la variedad natural *aizawai* (Sauka y Benintende, 2008). Según el modelo de unión toxina-receptor propuesto en *Plutella xylostella*, al menos las toxinas 1A, 1B y 1C no comparten los mismos receptores de membrana (Ballester *et al.*, 1999), por lo que su acción puede provocar un mayor deterioro del epitelio del mesenterón.

El periodo de pupación de *S. littoralis* es alrededor de dos días mayor en las hembras que en los machos (Vargas-Osuna, 1985) tal y como también reflejan nuestros resultados. Tanto el tratamiento con *B. thuringiensis* var. *aizawai* como con *P. polymyxa* transformada provocaron ligeras desviaciones en dicho periodo (menos de un día), que no fueron determinantes en el tiempo total de desarrollo, manteniéndose casi con las mismas diferencias observadas de desarrollo larvario. Resultados similares han sido obtenidos en esta misma especie con un biopreparado comercial (MVP) de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Hatem, 2006).

Los tratamientos con *B. thuringiensis* var. *aizawai* y con *P. polymyxa* transformada disminuyeron significativamente el peso de pupas de ambos sexos, como también se ha señalado con preparaciones comerciales de *B. thuringiensis* (EL-Aw, 2003). Este efecto debe estar relacionado con la inhibición de la alimentación y menor capacidad de asimilación de nutrientes de las larvas que sobreviven al tratamiento, como se comentó anteriormente.

Las dosis subletales de *B. thuringiensis* var. *aizawai* y *P. polymyxa* transformada causaron una reducción significativa del porcentaje de viabilidad de huevos y esto no fue debido a problemas de copulación ni de fertilización de las hembras, ya que no hubo diferencias en los porcentajes de hembras copuladas ni de hembras fértiles, ni tampoco en el número de espermátóforos. Reducciones similares se han obtenido en esta misma especie con *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Sondos *et al.*, 2000) y con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Hatem, 2006). En algunos casos se ha señalado además disminución en la fecundidad de las hembras (Sondos *et al.*, 2000; El-Aw, 2003). Esta reducción de viabilidad de huevos en adultos procedentes de larvas tratadas con dosis subletales de *B. thuringiensis* también se ha

citado en otros lepidópteros, como *S. litura* (Yang *et al.*, 1985) y *H. armigera* (Gujar *et al.*, 2001), sin que se haya encontrado una interpretación de las causas que lo originan. Sí se ha visto que la disminución de viabilidad de huevos en larvas de *S. littoralis* tratadas con dosis subletales de baculovirus (Aldebis *et al.*, 1993) es debida a deficiencias en la espermatogénesis, cuyo principales etapas tienen lugar durante los últimos estadios del desarrollo larvario de lepidópteros, y se ha sugerido que pueda estar relacionado cambios hormonales.

5.2. Persistencia de la actividad insecticida en hojas de algodón

La superficie de las hojas ha sido considerada durante largo tiempo un medio hostil para la colonización y supervivencia bacteriana, al estar expuesta a rápidas fluctuaciones de temperatura y humedad relativa, así como a frecuente alternancia de presencia y ausencia de agua libre. Sin embargo, en los últimos años se está dedicando un gran esfuerzo en la identificación, diversidad y comportamiento de las bacterias presentes en la filosfera, llegando a establecer que las interacciones de éstas con la plantas va más allá de un simple comensalismo (Lindow y Brandl, 2003).

No todos los microorganismos que llegan a la filosfera son capaces de colonizar y crecer, pues esto depende de condiciones ambientales, de características fisicoquímicos y genéticas de la planta y de las propiedades específicas de los propios microorganismos (Whipps *et al.*, 2008). Tras la aplicación por pulverización foliar de un insecticida microbiano, diferentes factores ambientales influyen en la supervivencia y persistencia de la actividad insecticida del entomopatógeno, destacando la radiación solar y la temperatura (Leong *et al.*, 1980).

Nuestros resultados indican que, en condiciones de campo, *P. polymyxa* transformada mantiene su actividad insecticida al menos durante 30 días después de la aplicación de una mezcla de esporas y cristales sobre plantas de algodón, con valores de mortalidad en larvas neonatas de *S. littoralis* que oscilaron entre 46,7 y 100%, siendo al final del 50% de las larvas tratadas. Estos datos indican una elevada persistencia de la actividad tóxica de la bacteria. De forma similar, Bora *et al.* (1994) encontraron en plantas de algodón tratadas con una mezcla de esporas y cristales que la cepa transformada *B. megaterium* (que contiene el gen *cry1Ac*) mantuvo durante las tres semanas de observación una alta actividad insecticida para larvas de primer estadio de *H. armigera*, mientras que la cepa salvaje de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 perdió casi por completo la actividad insecticida 7 días después del tratamiento, lo que

se explica por el efecto adverso que tuvo la radiación solar y temperatura, que afectó en menos medida a la bacteria transformada.

Del mismo modo, en condiciones de semicampo (umbráculo) y de invernadero, la evolución de la actividad insecticida, entre 1 y 28 días después del tratamiento, de *P. polymyxa* transformada, aunque muestra una tendencia a disminuir, mantiene niveles del 50% de mortalidad larvaria al final del ensayo. La persistencia de la actividad tóxica de la cepa natural, *B. thuringiensis* var. *aizawai*, fue similar a la cepa transformada, probablemente debido a la menor radiación solar y temperatura más estable que se dieron respecto a las condiciones de campo.

5.3. Supervivencia en el interior del tejido foliar

En hojas de algodón tratadas con mezcla de cristales y esporas de *P. polymyxa*, tanto la cepa transformada como la natural, tuvieron altos niveles de supervivencia en los tejidos foliares al menos hasta los 28 días después del tratamiento, resultados que fueron corroborados en condiciones de campo, semicampo e invernadero mediante cultivo en medio selectivo de muestras foliares de las plantas tratadas. Ibrahim *et al.* (2006) con una cepa bacteriana transformada con el gen *cry1C* encuentran también elevada supervivencia de la bacteria, de hasta 40 días después de la aplicación foliar en algodón.

B. thuringiensis var. *aizawai* tuvo niveles de supervivencia muy similares a *P. polymyxa*, coincidiendo con Sudha (1999), quien encontró que *B. thuringiensis* var. *kurstaki* fue capaz de sobrevivir en plantas de arroz hasta 15 días después del tratamiento, con una persistencia similar a la de *P. polymyxa* transformada que contenía el gen *cry1Ac*.

Bora *et al.* (1994) observan en tinciones bajo microscopio óptico la presencia de células vegetativas, esporas y cristales en el envés de hojas de algodón 30 días después de la pulverización con la cepa transformada *B. megaterium* (que contiene el gen *cry1Ac*). Estos autores suponen que la presencia de cristales se debe a sucesivos ciclos de formación de células vegetativas y de esporulación. La alta persistencia encontrada por nosotros para *P. polymyxa* y *B. thuringiensis* var. *aizawai* puede ser explicada por este motivo, aunque no se verificó la presencia de cristales en el envés de las hojas de algodón tratadas,

En los trabajos anteriormente citados no se menciona la posibilidad de la entrada y colonización de las bacterias en el tejido foliar. Se conocen actualmente una amplia diversidad de bacterias endófitas asociadas a plantas cultivadas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006) que se localizan en los espacios intercelulares y, con menor frecuencia,

intracelularmente y en tejidos vasculares. Entre las bacterias endófitas se citan especies como *Bacillus* spp. en cítricos, *B. megaterium* en maíz, zanahoria y cítricos (Araujo *et al.*, 2001; 2002) y *Paenibacillus odorifer* en batata (Reiter *et al.*, 2003). La penetración en la planta puede ocurrir por los estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, incluyendo la producción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared de las células vegetales (Pérez *et al.*, 2009). Así, por ejemplo, por microscopía electrónica de transmisión se han visto células vegetativas de una bacteria fijadora de Nitrógeno (transformada con el gen *cry1C*) en los espacios intercelulares de la epidermis foliar 40 días después de una pulverización foliar en algodón (Ibrahim *et al.*, 2006).

En nuestro estudio, el análisis de proteínas por SDS-PAGE detectó la presencia de la toxina Cry1C en hojas de algodón 14 días después del tratamiento con *P. polymyxa* transformada, así como también cuando el tratamiento fue con *B. thuringiensis* var. *aizawai*. Además, el gen *cry1C* fue detectado por PCR hasta 28 días después del tratamiento. Todo ello constituye una evidencia de la presencia de ambas bacterias en el interior de tejido foliar y puede explicar, al menos en parte, la elevada persistencia de la actividad insecticida detectada por ambas bacterias. No obstante, se requieren nuevos estudios que permitan definir la cantidad y capacidad de multiplicación de estas bacterias en el interior de los tejidos foliares.

5.4. Selección de poblaciones de *S. littoralis* resistentes

Poblaciones resistentes a *B. thuringiensis* o a sus toxinas han sido encontradas, tanto en campo como por selección en laboratorio, en diferentes especies tales como *Plodia interpunctella*, *H. virescens*, *S. littoralis*, *S. exigua* y *Aedes aegypti* (Tabashnik, 1994; Gould *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Rahardha y Whalon, 1995; Ballester *et al.*, 1999; Dingha *et al.*, 2004; Muller-Cohn *et al.*, 1996). El estudio de estas poblaciones ha permitido reconocer dos mecanismos principales de resistencia: aumento de la actividad proteolítica del mesenterón (Oppert *et al.*, 1997) y la alteración del sitio de unión de la toxina Cry en la membrana de las células del mesenterón (Ferré y Van Rie, 2002). Estos mecanismos han sido los más estudiados hasta la fecha (Griffitts y Aroian, 2005; Bravo *et al.*, 2005). No obstante, en base a una primeras evidencias obtenidas por microscopía electrónica, se ha propuesto un tercer mecanismo consistente en la más rápida regeneración de las células del mesenterón, que intervendría en la resistencia algunas cepas de *B. thuringiensis* o a toxinas Cry específicas (Forcada *et al.* 1999; Martinez-Ramirez *et al.*, 1999).

La selección para resistencia a *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* durante 12 generaciones consecutivas de *S. littoralis*, no alteró la susceptibilidad de la población larvaria. Las CL_{50} no mostraron cambios estadísticamente significativos, situándose en valores comprendidos entre $4,23 \times 10^7$ y $10,4 \times 10^7$ esp+cri/ml y las pendientes de las rectas de regresión Probit oscilaron entre el valor mínimo de 1,06 en la generación inicial y el máximo de 1,53 en la 4ª generación. No se puede hablar por tanto de que se haya seleccionado algún factor de resistencia durante las generaciones estudiadas.

Sin embargo, en la población seleccionada se detectaron alteraciones del potencial biológico, como reducción en los periodos de desarrollo larvario y de pupación, aumento del peso de las pupas, incremento en la longevidad de machos. Muchos de estos parámetros confieren mayor valencia ecológica a esta especie polivoltina cuando sus poblaciones son tratadas de forma continuada con dosis subletales de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, de lo que se deduce la importancia de aplicaciones en campo eficaces teniendo siempre muy en cuenta la oportunidad y el momento del tratamiento. El único efecto adverso fue el de la disminución del porcentaje de viabilidad de huevos, similar al encontrado cuando las larvas son tratadas con dosis subletales de esta bacteria.

En cuanto a la selección de resistencia a *P. polymyxa* transformada se detectó una progresiva reducción de la susceptibilidad larvaria, pues las CL_{50} fueron aumentando hasta la generación 12 que fue de $3,9 \times 10^8$ esp+cri/ml, con un factor de resistencia respecto de la población original de 5,47. A este hecho se unió el incremento de la pendiente de regresión Probit principalmente en las generaciones 8 y 12, respecto de la inicial y de la generación 4, lo que puede ser un reflejo de pérdida de variabilidad genética como consecuencia de la selección de resistencia. Por todo ello, pensamos que en este caso se ha seleccionado una población tolerante o posiblemente resistente, si bien se requieren estudios de la herencia de esta resistencia y de los mecanismos implicados. En la bibliografía consultada se cita la selección en laboratorio de una población de *S. littoralis* tolerante a la toxina Cry1C tras 14 generaciones de selección (Muller-Cohn *et al.*, 1996).

Algunos parámetros biológicos de la población seleccionada para resistencia a *P. polymyxa* transformada se vieron alterados. El desarrollo se caracterizó por un aumento en el peso de las pupas, lo que puede ser deberse a un mayor rendimiento de las larvas en la digestión y absorción de los nutrientes, como se ha visto en una población de *S. exigua* resistente a Cry1C (Dingha *et al.*, 2004). Estudios recientes sugieren que factores asociados con la respuesta fisiológica a dosis subletales de toxina Cry pueden ser heredados epigenéticamente (Rahman *et al.*, 2011) por lo que la herencia de la resistencia asociada a las

toxinas Cry puede ser más compleja que la sola resistencia debida a la unión toxina-receptor. Por otro lado, la fecundidad de las hembras aumentó significativamente, lo que se corresponde con el mayor peso de las pupas, pero se redujo el porcentaje de viabilidad de huevos.

En general, estos resultados apuntan el riesgo de que se desarrollen poblaciones resistentes en situaciones de aplicaciones continuadas en campo. La alta presión ejercida por una sola proteína Cry y la relativamente escasa pérdida de valencia ecológica en las poblaciones expuestas a alta presión de selección, podría originar un más rápido desarrollo de resistencia y el mantenimiento de ésta durante más tiempo en condiciones de campo.

5.5. Influencia de la *Paenibacillus polymyxa* en la planta

La aplicación en suelo de la bacteria *P. polymyxa* produjo un aumento de la actividad nitrogenasa y del contenido de Nitrógeno en la parte epígea de las plantas de algodón inoculadas. Akhtar y Siddiqui (2007) obtienen en plantas de garbanzo incrementos de niveles de nitrógeno, fósforo y potasio. Este efecto se ha encontrado también en otras bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Serratia marcescens* en arroz (Gyaneshwar *et al.*, 2001).

P. polymyxa transformada mejoró también la actividad nitrogenasa y el contenido de Nitrógeno, incluso en mayor medida que *P. polymyxa* no transformada, lo cual puede dar lugar a un mayor crecimiento de planta y rendimiento del cultivo, que es necesario confirmar en estudios de campo. Así, por ejemplo, la pulverización de una cepa de *P. polymyxa*, a la cual se le introdujo el gen *cry1Ac* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, mejoró el rendimiento de plantas de arroz tratadas, incrementando el peso seco de raíz y de tallo (Sudha *et al.*, 1999).

Además, la inoculación de *P. polymyxa* (tanto la original como la transformada) produjo un aumento de los niveles de clorofila A que se mantuvieron por encima de las plantas no tratadas durante las dos primeras semanas. En el caso de la clorofila B, AB y carotenoides hubo una tendencia creciente en el transcurso de las cuatro semanas del ensayo, aunque en la tercera se produjo un descenso sólo en el tratamiento con *P. polymyxa* transformada. Estos resultados está de acuerdo con el aumento de los niveles clorofila en plantas de garbanzo inoculadas con *P. polymyxa* (Akhtar y Siddiqui, 2007).

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. Las larvas de *S. littoralis* son susceptibles a la acción por ingestión de cristales y esporas de la bacteria *P. polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*), así como a *B. thuringiensis* var. *aizawai* que contiene este gen de forma natural. La toxicidad de ambas bacterias es similar, con concentraciones medias para larvas de primer estadio de $7,04 \times 10^7$ (espora+cristal/ml) y $8,47 \times 10^7$ (espora+cristal/ml), respectivamente.
2. Las larvas supervivientes a la ingestión de dosis subletales de *P. polymyxa* transformada y de *B. thuringiensis* var. *aizawai* muestran un notable incremento en el periodo de desarrollo larvario, en mayor medida en el caso de *B. thuringiensis*, debido probablemente a la acción combinada de diferentes proteínas Cry que constituye el cristal de esta cepa natural. Así mismo, el peso de las pupas disminuye en ambos sexos.
3. La reproducción de adultos procedentes de larvas que ingieren dosis subletales de *P. polymyxa* transformada y de *B. thuringiensis* var. *aizawai* se ve afectada en una reducción del porcentaje de viabilidad de huevos, lo que representa un efecto de gran valor para el control de plagas polivoltinas, como es el caso de *S. littoralis*.
4. En condiciones de campo, la pulverización foliar de suspensiones de cristales y esporas de la bacteria transformada *P. polymyxa* mantiene actividad insecticida al menos durante 30 días después de la aplicación sobre plantas de algodón. Esta alta persistencia de la toxicidad se confirma también en condiciones de umbráculo y de invernadero, en donde es similar a *B. thuringiensis* var. *aizawai*.
5. Se ha demostrado la supervivencia de *P. polymyxa* transformada en el interior de las hojas de algodón durante al menos hasta 28 días después de la pulverización de cristales y esporas en plantas de algodón, lo mismo que ocurre con la cepa natural y con *B. thuringiensis* var. *aizawai*. La presencia de la toxina Cry1C en el interior de los tejidos foliares se ha confirmado por SDS-PAGE y la presencia de la bacteria mediante la detección del gen *cry1C* por PCR.

6. Durante 12 generaciones de selección de una población de *S. littoralis* para resistencia a *B. thuringiensis* var. *aizawai* no se alteró la susceptibilidad larvaria. Sin embargo, en la población final seleccionada se detectaron cambios en parámetros de desarrollo y reproductivos, principalmente reducción del periodo de desarrollo y disminución en la viabilidad de huevos.
7. En cambio, durante 12 generaciones de selección para resistencia a *P. polymyxa* transformada se detectó una progresiva reducción de la susceptibilidad larvaria a la bacteria hasta alcanzar en un factor de resistencia de 5,47. La población tolerante se caracteriza biológicamente por mayor peso de las pupas y fecundidad de hembras y menor porcentaje de viabilidad de huevos.
8. La aplicación en suelo de *P. polymyxa* transformada produjo un aumento de la actividad nitrogenasa y del contenido de Nitrógeno en la parte epigea de las plantas de algodón inoculadas, incluso en mayor medida que *P. polymyxa* no transformada.
9. Los niveles de clorofila y carotenoides aumentaron progresivamente durante cuatro semanas después de la inoculación del suelo con *P. polymyxa* transformada de forma similar a *P. polymyxa* no transformada.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*, **18**: 265-267.

ABDALLAH, M.D. y ABUL-NASR, S. 1970. Effect of *Bacillus thuringensis* on reproductive potential of the cotton leafworm. *Bull Entomol Soc Econ Ser*, **4**: 171-176.

ABDEL-RAHMAN, A.M., ZOHDY, N., EL-MOURSY, A.A., KARES, E.A. y EL-MANDARAWY, M.B.R. 2000. Qualitative differential haemocyte counts in healthy and parasitized larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) after insecticide treatments. *Egyptian J Agric Res*, **78**: 1549-1568.

ABDEL-RAZEK, A.S. y ABD-ELGAWAD, M.M. 2007. Investigations on the efficacy of entomopathogenic nematodes against *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Galleria mellonella* (L.). *Arch Phytopathol Plant Prot*, **40**: 414-422.

ABUL-NASR, S. 1956. Polyhedrosis virus-disease on cotton leafworm, *Prodenia litura* F. *Bull Soc Entomol Egypte*, **40**: 321-332.

ABUL-NASR, S. y EL-NAGAR, M.S. 1980. The susceptibility of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.), to different isolates of nuclear polyhedrosis virus. *J Appl Entomol*, **90**: 289-292.

AGAISSE, H. y LERECLUS, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol*, **177**: 6027-6032.

AKHTAR, M.S. y SIDDIQUI, Z.A. 2007. Biocontrol of a chickpea root-rot disease complex with *Glomus intraradices*, *Pseudomonas putida* and *Paenibacillus polymyxa*. *Aus. Plant Pathol*, **36**: 175-180.

ALDEBIS, H.K.; VARGAS OSUNA, E.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 1993. Desarrollo del sistema reproductor interno del macho de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) tratado en estado de larva con el virus de la poliedrosis nuclear (Baculoviridae). *Bol San Veg Plagas*, **19**: 3-9.

ALDEBIS, H.K., VARGAS-OSUNA, E. y SANTIAGO-ALVAREZ, C. 1994. Caracterización serológica de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner aisladas de insectos (Baculoviridae). *Bol San Veg Plagas*, **20**: 765-769.

- ARMENGOL, G., ESCOBAR, M., MALDONADO, M. y ORDÚZ, S. 2007.** Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *J Appl Microbiol*, **102**: 77-88.
- ARNON, D. 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, **24**: 1-15.
- ARONSON, A.I., BECKMAN, W. y DUNN, P. 1986.** *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. En *Microbiol. Rev.* (J.L. Ingraham, Ed.). Washington D.C. American Society for Microbiology. pp. 1-24.
- ASH, C., PRIEST, F.G. y COLLINS, M.D. 1993.** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Anton Leeuw*, **64**: 253-260.
- ATALLA, F.A., EL-ZOGHBY, A.A. y EWEIS, M.A. 2001.** Susceptibility of the three lepidopterous pests, *Sesamia cretica* (Led.), *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) to the bacterial biocide "Agerin". *Egyptian J Biol Pest Control*, **11**: 45-49.
- BABU, B.G., UDAYASURIYAN, V., MARIAM, M.A., SIVAKUMAR, N.C., BHARATHI, M. y BALASUBRAMANIAN, G. 2002.** Comparative toxicity of Cry1Ac and Cry2Aa delta endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (H.). *Crop Protection*, **21**: 817-822.
- BADII, M.H., FLORES. A.E., FOREUGHBAKHCH, R., QUIROZ, H. y TORRES, R. 1996.** Ecología de manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control biológico de insectos. En: Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. pp. 40-47.
- BALL, D.A., TAYLOR, R., TODD, S.J., REDMOND, C., COUTURE-TOSI, E., SYLVESTRE, P., MOIR, A. y BULLOUGH, P.A. 2008.** Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Mol Microbiol*, **68**: 947-958.
- BALLESTER, V., GRANERO, F., TABASHNIK, B.E., MALVAR, T., y FERRÉ, J. 1999.** Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl Environ Microbiol*, **65**: 1413-1419.

- BARLOY, F., LECADET, M.M. y DELECLUSE, A. 1998.** Distribution of clostridial *cry*-like genes among *Bacillus thuringiensis* and *Clostridium* strains. *Curr Microbiol*, **36**: 232-37.
- BAUM, J. y GONZÁLEZ, J. 1992.** Mode of replication size and distribution of naturally occurring plasmids in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, **96**: 143-8.
- BAUM, J.A. y MALVAR, T. 1995.** Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*, **18**: 1-12.
- BEEGLE, C.C. y YAMAMOTO, T. 1992.** History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can Entomol*, **124**: 587-616.
- BEL, Y., GRANERO, F., ALBEROLA, T., MARTÍNEZ-SEBASTIÁN, M.J. 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., 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.
- BEN-DOV, E., NISSAN, G., PELLEG, N., MANASHEROB, R., BOUSSIBA, S. y ZARITSKY, A. 1999.** Refined, circular restriction map of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid carrying the mosquito larvicidal genes. *Plasmid*, **42**: 186-191.
- BENZ, G. 1987.** Environment. En: *Epizootiology of infectious diseases*. (J.R. Fuxa y Y. Tanada, Eds.). John Wiley & Sons, N.Y. pp. 177-214.
- BERLINER, E. 1915.** About the sleep sickness of the *Ephestia kühniella* Zell. and its vector *Bacillus thuringiensis*. *Z Angew Entomol*, **2**: 29-56.
- BERNHARD, K. y UTZ, R. 1993.** Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. En: *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide* (P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs, Eds). Chichester, John Wiley. pp. 255-267.
- BERNHARD, K., JARRETT, P., MEADOWS, M., BUTT, J., ELLIS, D.J., ROBERTS, G.M., PAULI, S., RODGERS, P., y BURGESS, H.D. 1997.** Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol*, **70**: 59-68.

- BERRY, C., O'NEIL, S., BEN DOV, E., JONES, A.F., MURPHY, L., QUAIL, M.A., HOLDEN, M.T., HARRIS, D., ZARITSKY, A. y PARKHILL, J. 2002.** Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 5082-5095.
- BETZ, F.S., HAMMOND, B.G. y FUCHS, R.L. 2000.** Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. *Reg Toxicol Pharmacol*, **32**: 156-173.
- BISHARA, I. y EL-ZOHERIY, M.S. 1940.** The cotton leaf-worm problem in Egypt. VI Congreso Internacional de Entomología. Madrid (España) 1935.
- BORA, R., MURTY, M., SHENBARGARATHAI, R. y SEKAR, V. 1994.** Introduction of Lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phylloplane. *Appl Environ Microbiol*, **60**: 214-22.
- BRAR, S., VERMA, M., TYAGI, R. y VALÉRO, J. 2006.** Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* **41**: 323-342.
- BRAVO, A. 1997.** Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin family proteins and their functional domains. *J Bacteriol*, **179**: 2793-2801.
- BRAVO, A., SARABIA, S., LÓPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, A., ORTIZ, M., LINA, L., VILLALOBOS, F.J., PEÑA, G., NUÑEZ-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.
- BRAVO, A., GÓMEZ, I., CONDE, J., MUÑOZ-GARAY, C., SÁNCHEZ, J. y MIRANDA, R. 2004.** Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*, **1667**: 38-46.
- BRAVO, A. y CERÓN, J. 2004.** *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Universidad Nacional de Colombia, Ed. Buena Semilla, Bogotá.
- BRAVO, A., SOBERÓN, M. y GILL, S.S. 2005.** *Bacillus thuringiensis*: mechanisms and use. *Comprehensive Molec Insect Sci*, **6**: 175-205.
- BRAVO, A., GILL, S.S. y SOBERÓN, M. 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49**: 423-435.

- BROWN, E.S. y DEWHURST, C.F. 1975.** The genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) in África and the Near East. *Bull Res*, **65**: 221-262.
- CABALLERO, P., VARGAS-OSUNA, E., ALDEBIS, H.K. y SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 1990.** Parásitos asociados a poblaciones naturales de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) y *S. exigua* Hb. (Lepidoptera: Noctuidae). *Bol San Veg Plagas*, **16**: 91-96.
- CABELLO, T. 1988.** Estudio sobre la biología de *Trichoplusia orichalcea* F. (Lep.: Noctuidae) en condiciones controladas. *Actas III Congreso Ibérico de Entomología*, 925-936.
- CABELLO, T. y BELDA, J. 1994.** Noctuidos plaga (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivos hortícolas en invernaderos. En: *Sanidad vegetal en la horticultura protegida* (R. Moreno, Ed.). Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla. pp. 179-221.
- CARLSON, C.R., CAUGANT, D.A. y KOLSTO, A.B. 1994.** Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol*, **60**: 1719-1725.
- CAROZZI, N.B., KRAMAER, V.C., WARREEN, G.W., EVOLA, S. y KOZID, M.G. 1991.** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl Environ Microbiol*, **57**: 3057-3061.
- CARTER, D.J. 1984.** Pest Lepidoptera of Europe with special reference to the British Isles. (K.A. Spencer, Ed.). Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht. pp. 288-290.
- CAYROL, R.A. 1972.** Famille des Noctuidae. En: *Entomologie appliquée à l'Agriculture* (A.S. Balachowsky, Ed.). Tomo II. Vol.2. Lépidoptères. Masson et Cie. París. pp. 1403-1411.
- CAYROL, R.A.; POITOUT, S. y ANGLADE, P. 1974.** Étude comparée des caractères biologiques respectifs de quelques espèces de Noctuidae plurivoltines migrantes et sédentaires. *Ann Zool Ecol Anim*, **6**: 245-254.
- CERÓN, J.A.B. 2004.** Productos comerciales: nativos y recombinantes. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico (Bravo, A. y Cerón, J., Eds). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 123-147.
- CERÓN, J., ORTIZ, A., QUINTERO, R., GUERECA, L. y BRAVO, A. 1995.** Specific PCR primers directed to identify *cry I* and *cry III* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol*, **61**: 3826-3831.

- CHANWAY, C.P., NELSON L.M. y HOLL, F.B. 1988.** Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by coexistent *Bacillus* species. *Can J Microbiol*, **34**: 925-929.
- CHILCOTT, C.N. y WIGLEY, P.J. 1993.** Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J Invertebr Pathol*, **61**: 244-247.
- CHAVEZ, P., YARLEQUE, C., LOAYZA, H., MARES, V., HANCCO, P., PRIOU, S., MARQUEZ, M.D., POSADAS, A., ZOROGASTA, P., FLEXAS, J., y QUIROZ, R. 2012.** Detection of bacterial wilt infection caused by *Ralstonia solanacearum* in potato (*Solanum tuberosum* L.) through multifractal analysis applied to remotely sensed data. *Precis Agric*, **13**: 236-255.
- CINAR, C., APAYDIN, O., YENIDUNYA, A.F., HARSA, S. y GUNES, H. 2008.** Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. *J Appl Microbiol*, **104**: 515-525.
- CRICKMORE, N. 2012.** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature” http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, revisado el 28/06/2012.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., FEITELSON, J., SCHNEPF, 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.
- DAI, S., GAO, M., LI, X. y LI, R. 1996.** Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of north and south of China. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **36**: 295-302.
- DE BARJAC, H. y BONNEFOI, A. 1968.** A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *J Invertebr Pathol*, **11**: 335-347.
- DE LIÑAN, C. 2012.** *Vademecum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*. Ediciones Agrotécnicas. Madrid.
- DE SOUZA, J.D., JAIN, S., DE OLIVEIRA, C., AYRES, C. y LUCENA, W.A. 2009.** Toxicity of a *Bacillus thuringiensis israelensis* like strain against *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*, **54**: 467-473.
- DINGHA, B.N., MOAR, W.J. y APPEL, A.G. 2004.** Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin on the metabolic rate of Cry1C resistant and susceptible *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Physiol Entomol*, **29**: 409-418.

- DOMÍNGUEZ, F. 1993.** *Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 821pp.
- DOWN, R.E., BELL, H.A., MATTHEWS, H.J., KIRKBRIDE-SMITH, A.E. y EDWARDS, J.P. 2004.** Dissemination of the biocontrol agent *Vairimorpha necatrix* by the spined soldier bug, *Podisus maculiventris*. *Entomol Exper Appl*, **110**: 103-114.
- DULMAGE H.T., CORREA J.A. y GALLEGOS-MORALES G. 1990.** Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standarization and fermentation development. En: *Bacterial control of mosquitoes & black flies*. Edit. Rutgers University.
- EL-AW, M.A. 2003.** Bioassays and sublethal effects of various selected insecticides on some biological aspects of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Alexandria J Agric Res*, **48**: 73-82.
- EL-GUINDY, M.A., ABDEL-SATTAR, M.M. y EL-REFAI, A.M. 1983.** On the interaction of the insecticides and insect growth regulators on the biotic and resistant strains of *Spodoptera littoralis*. *J Appl Entomol*, **95**: 75-83.
- EL-KIFL, T.A.H. 1991.** Effect of cold storage on the efficacy of entomogenous nematodes. *Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo*, **42**: 435-442.
- EL-SEBAEY, I.I.A. 2001.** Biology and predation rates of the assassin bug, *Coranus africana* El-Sebaey (Heteroptera: Reduviidae) on the cotton pests, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ypsilon* Rott. *Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University*, **52**: 655-668.
- EL-ZEMAITY, M.S., EL-DEEB, W.M., OSMAN, Y.A. Y HUSSIEN. A.I. 2003.** Development of resistance of *Spodoptera littoralis* to certain bioinsecticides. *J Enviro Sci*, **6**: 793-810.
- ENGLISH, L. y SLATIN, S.L. 1992.** Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem Mol Biol*, **22**: 1-7.
- ESPINOSA, A. y HODGES, A. 2009.** Egyptian cotton worm, *Spodoptera littoralis*. [http://wiki.bugwood.org/Spodoptera_littoralis].
- ESTRUCH, J.J., WARREN, G.W., MULLINS, M.A. NYE, G.J., CRAIG, J.A. y KOZIEL, M.G. 1996.** Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**: 5389-5394.

- FAST, P.G. 1981.** The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. En: *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980* (H.D. Burges, Ed.). New York, London. Academic Press Inc. pp. 223-248.
- FEDERICI, B.A. 2002.** Case study: Bt crops a novel mode of insect resistance. En: *Genetically modified crops: assessing safety* (K. Atherton, Ed.). Taylor & Francis Group. London. pp. 164-200.
- FEDERICI, B.A. y BAUER, L.S. 1998.** Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 4368-4371.
- FELSENSTEIN, J. 1989.** PHYLIP-phylogeny inference package (version 2). *Cladistics*, **5**: 164-166.
- FERRÉ, J., GRANERO, F., GONZÁLEZ-CABRERA, J. y BALLESTER, V. 2001.** Bases de la resistencia a *Bacillus thuringiensis* y estrategias de control en el uso de plantas transgénicas. En: *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas* (P. Caballero y J. Ferré, Eds.) Phytoma-España. Valencia. pp. 271-296.
- FERRÉ, J. y VAN RIE, J. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, **47**: 501-533.
- FINNEY, D.J. 1971.** *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- FORCADA, C., ALCACER, E., GARCERÁ, M.D., TATO, A. y MARTÍNEZ, R. 1999.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **42**: 51-63.
- GAERTNER, F., QUICK, T. y THOMPSON, M. 1993.** CellCap: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins. En: *Advanced engineered pesticides* (L. Kim, Ed). Marcer Dekker. pp.73-83.
- GAWRON-BURKE, C. y BAUM, J. 1991.** Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria. *Genet Eng (NY)*, **13**: 237-63.

- GAVIRIA RIVERA, A.M. y PRIEST, F.G. 2003.** Pulsed field gel electrophoresis of chromosomal DNA reveals a clonal population structure to *Bacillus thuringiensis* that relates in general to crystal protein gene content. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**: 61-66.
- GELERNTER, W.D. 1990.** Targeting insecticide-resistant markets: New developments in microbial-based products. En: *Managing resistance to agrochemicals: From fundamental research to practical strategies* (M.B. Green, W.K. Moberg, H. LeBaron, Eds). Washington, DC, American Chemical Society. pp. 105-117 (ACS Series 421).
- GEORGHIOU, G.P. y LAGUNES-TEJEDA, A. 1991.** *The occurrence of resistance to pesticides in arthropods*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- GILL, S.S., COWLES, E.A. y PIETRANTONIO, P.V. 1992.** The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol*, **37**: 615-636.
- GOLDBERG, L.J. y MARGALIT, J. 1977.** A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, **37**: 355-358.
- GÓMEZ, I., SÁNCHEZ, J., MIRANDA, R., BRAVO, A. y SOBERÓN, M. 2002.** Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett*, **513**: 242-246.
- GÓMEZ BUSTILLO, M.R., ARROYO VARELA, M. y YELA GARCÍA, J.L. 1979.** *Mariposas de la Península Ibérica. Heteroceros III*. MAPA - ICONA. Madrid. 263 pp.
- GÓMEZ-CLEMENTE, F. y DEL RIVERO, J.M. 1951.** La "rosquilla negra" (*Prodenia litura* F.). *Bol Pat Veg Entomol Agric*, **19**: 221-278.
- GÓMEZ DE AIZPÚRUA, C. y ARROYO VARELA, M. 1994.** *Principales noctuidos actuales de interés agrícola*. Edigur. Madrid. 145 pp.
- GONZÁLEZ, J.R., DULMAGE, H.T., y CARLTON, B.C. 1981.** Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, **5**: 351-365.
- GONZÁLEZ-CABRERA, J. 2001.** Plantas transgénicas con la capacidad insecticida de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero P, Ferré J, editores. *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*, pp. 169-87.

- GONZÁLEZ VALENZUELA, M.; RUIZ LOPEZ, M. y LINEIRO, L.D. 2001.** Acción de dos reguladores del crecimiento sobre *Spodoptera frugiperda* (S. y A.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev Protección Veg*, **16**: 20-22.
- GOULD, F. 1998.** Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Ann Rev Entomol*, **43**: 701-726.
- GOULD, F., ANDERSON, A., REYNOLDS, A., BUMGARNER, L. y MOAR, W. 1995.** Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Econ Entomol*, **88**: 1545-1559.
- GRIFFITTS, J.S., HASLAM, S.M., YANG, T., GARCZYNSKI, S.F., MULLOY, B., MORRIS, H., CREMER, P.S., DELL, A., ADANG, M.J., AROIAN, R.V. 2005.** Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Sci*, **307**: 922-92.
- GRIKO, N., ROSE-YOUNG, L., ZHANG, X., CARPENTER, L., CANDAS, M. y IBRAHIM, M.A. 2007.** Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. *Biochemistry*, **46**: 10001-10007.
- GUJAR, G.T.; KALIA, V. y ARCANA, K. 2001.** Effect of sublethal concentration of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on food and developmental needs of the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Indian J Exper Biol*, **39**: 1130-1135.
- GUTTMAN, D. y ELLAR, D. 2000.** Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiol Lett*, **188**: 7-13.
- HAFEZ, M., TAWFIK, M.F.S., AZAB, A.K. y IBRAHIM, A.A. 1976.** Survey and economic importance of parasites of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) *Bull Soc Entomol Egypte*, **60**: 179-189.
- HANSEN, B.M., DAMGAARD, P.H., EILENBERG, J. y PEDERSEN, J.C. 1998.** Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J Invertebr Pathol*, **71**: 106-114.
- HARDY, R., BURNS, R. y HOLSTEN, T. 1973.** Application of the acetylene reduction assay for the measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Bioch*, **5**: 47-81.
- HATEM, A.E. 2001.** Studies on some factors affecting the potentiality of chemical control of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Thesis of Master. Minufya University. Faculty of Agriculture Shibin El-Kom, Egypt. 173 pp.

- HATEM, A.E. 2006.** Comparación de los efectos insecticidas selectivo sobre el desarrollo y reproducción de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 195 pp.
- HATEM, A.E., ABDEL-SAMAD, S.S.M., SALEH, H.A., SOLIMAN, M.H.A. y HUSSIEN, A.I. 2009.** Toxicological and physiological activity of plant extracts against *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Bol San Veg Plagas*, **35**: 517-531.
- HATEM A.E., ALDEBIS, H.K. y VARGAS-OSUNA, E. 2011.** Effects of the *Spodoptera littoralis* Granulovirus on the development and reproduction of cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Biol Control*, **59**: 192-199.
- HEDGES, A.J. 2002.** Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *Int J Food Microbiol*, **76**: 207-14.
- HEIMPEL, A.M. 1967.** A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Ann Rev Entomol*, **12**: 287-322.
- HEIMPEL, A.M. y ANGUS, T.A. 1958.** The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus*. *Can J Microbiol*, **4**: 531-541.
- HELGASON, E., ØKSTAD, O.A., CAUGANT, D.A., JOHANSEN, H.A., FOUET, A., MOCK, M., HEGNA, I. y KOLSTØ, A.B. 2000.** *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*, one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 2627-2630.
- HERTING, B. y SIMMONDS, F.J. 1976.** *A catalogue of parasites and predators of terrestrial arthropods*. Vol.VII. Lepidoptera. Part 2. CAB, Farnham Royal. Stough SL 2 3Bn. England. 221 pp.
- HEULIN, T., BERGE, O., MAVINGUI, P., GOUZOU, L., HEBBAR, K.P., y BALANDREAU, J. 1994.** *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N₂-fixing bacteria associated with wheat rhizosphere in French soils. *Eur J Soil Biol*, **30**: 35-42.
- HISCOX, J.D. y ISRAELSTAM, G.F. 1979.** A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot*, **57**: 1332-1334
- HÖFTE, H. y WHITELEY, H.R. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, **53**: 242-255.

- HOLL, F.B. Y CHANWAY, C.P. 1992.** Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can J Microbiol*, **38**: 303-308.
- HOLL, F.B., CHANWAY, C.P., TURKINGTON, R. y RADLEY, R.A. 1988.** Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem*, **20**: 19-24.
- HUBER, H.E. y LÜTHY, P. 1981.** *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Composition and activation. En: *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases* (E.W. Davidson, Ed.). Totowa, New Jersey. Allanheld-Osmun Publishers. pp. 209-234.
- IBARRA, J.E., DEL RINCÓN, M.C., ORDUZ, S., NORIEGA, D., BENINTENDE, G., MONNERAT, R., REGIS, L., DE OLIVEIRA, C.M.F., LANZ, H., RODRÍGUEZ, M.H., SANCHEZ, J., PEÑA, G. y BRAVO, A. 2003.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl Environ Microbiol*, **69**: 5269-5274.
- IBRAHIM, N.A.A. y OMAR, M.N.A. 2009.** Expression of the insecticidal protein gene cry1C of *Bacillus thuringiensis* in plantcolonizing nitrogen fixing bacteria. *Pest Technol*, **3**: 45-49.
- IBRAHIM, N.A.A., HASSAN, O.S. y OMAR, M.N.A. 2006.** Protection of cotton plant (*Gossypium barbadense*) against lepidopteran insects due to colonization with nitrogen fixing bacteria expressing the *Bacillus thuringiensis* toxin gene Cry1C. *Egypt J Genet Cytol*, **35**: 305-319.
- IBRAHIM, N.A.A., SANNA, A.O., MOHAMED, S.S. y MAGDY, A.M. 2008.** Construction of a potent strain of *Bacillus thuringiensis* against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *German J Agric For Res*, **58**: 111-123.
- ICHIMATSU, T., MIZUKI, E. y NISHIMURA, K. 2000.** Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Curr Microbiol*, **40**: 217-220.
- INAGAKI, S., MIYASONO, M., ISHIGURO, T., TAKEDA, R. y HAYASHI, Y. 1992.** Proteolytic processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J Inverteb Pathol*, **60**: 64-68.

- IRIARTE, J. y CABALLERO, P. 2001.** Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. En: *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas*. (P. Caballero y J. Ferré, Eds.). Phytoma-España. Valencia. pp. 15-44.
- IRIARTE, F.J., COSMAO-DUMANOIR, V., BEL, Y., PORCAR, M., FERRANDIS, M.D., LECADET, M.M., FERRÉ, J. y CABALLERO, P. 2000.** Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *balearica* (serotype H48) and ser. *navarrensis* (serotype H50), two novel serovars isolated in Spain. *Curr Microbiol*, **40**: 17-22.
- ISHAAYA, I. y KLEIN, M. 1990.** Response of susceptible laboratory and resistant field strains of *S. littoralis* (Lepidoptera : Noctuidae) to teflubenzuron. *J Econ Entomol*, **81**: 59-62.
- ISHIWATA, S. 1901.** On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho*, **114**: 1-5.
- JALALI, S.K., MOHAN, K.S., SINGH, S.P., MANJUNATH, T.M. y LALITHA, Y. 2004.** Baseline-susceptibility of the old-world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) populations from India to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal protein. *Crop Protection*, **23**: 53-59.
- JARRET, P. 1983.** Comparison of plasmids from twelve isolates of *Bacillus thuringiensis* H-serotype 7. *FEMS Microbiol Lett*, **16**: 55-60.
- JENSEN, G.B., WILCKES, A., PETERSEN, S.S., DAMGAARD, J., BAUM, J.A. y ANDRUP, L. 1995.** The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16. *J Bacteriol*, **177**: 2914-2917.
- JOUNG, K.B. y COTE, J.C. 2000.** A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Technical Bulletin No. 29. Agriculture and Agri-food Canada. Horticultural R & D Centre, Saint-Jean-sur-Richelieu (Canadá).
- JURAT-FUENTES, J. y ADANG, M. 2004.** Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem*, **35**: 271-3127.
- KAELIN, P., MOREL, P. y GADANI, F.1994.** Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Appl Environ Microbiol*, **60**:19-25.

- KAJIMURA, Y. y KANEDA, M. 1996.** Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation, and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, **49**: 129-135.
- KALMAN, S., KIEHNE, K., COOPER, N., REYNOSO, M. y YAMAMOTO, T. 1995.** Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl Environ Microbiol*, **61**: 3063-3068.
- KARAMANLIDOU, G., LAMBROPOULOS, A.F., KOLAIS, S.I., MANOISIS, 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.
- KAYA, H.K. 1993.** Entomogenous and entomopathogenic nematodes in biological control. En: *Plant parasites nematodes in temperate agriculture* (K. Evans y J.M. Webster, Eds.). CAB International. Wallingford, U.K.
- KE LUO, DAVID, B. y MICHAEL, J.A. 1999.** Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 457-464.
- KHAFAGI, W.E. y HEGAZI, E.M. 2004.** Is the host or the parasitoid in control?: Effects of host age and temperature on pseudoparasitization by *Microplitis rufiventris* in *Spodoptera littoralis*. *J Insect Physiol*, **50**: 577-584.
- KHETAN, S.K. 2001.** *Microbial Pest Control*. Marcel Dekker, Inc. New Yor. pp. 167-190.
- KIM, J.F., JEONG, H., PARK, S.Y., KIM, S.B., PARK, Y.K., CHOI, S.K., RY, C.M., HUR, C.H., GHIM, S.Y., OH, T.K., KIM, J.J., PARK, C.S. y PARK, S.H. 2010.** Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic Rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *J Bacteriol*, **192**(22): 6103-6104.
- KISLEV, M. y EDELMAN, M. 1982.** DNA restriction-pattern differences from geographic isolates of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, **119**: 219-222.
- KOLAIB, M.O., ABDELLA, M.M.H. y DARWIS, E.T.E. 1990.** Natural mortality of aphid lion (*Chrysopa vulgaris*) eggs. *Indian J Agric Sci*, **60**: 751-752.
- KRIEG, A. 1975.** Photoprotection against inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores y ultraviolet rays. *J Invertebr Pathol*, **25**: 267-268.

- KRONSTAD, J. W., SCHNEPF, H.E. y WHITELY, H.R. 1983.** Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J Bacteriol*, **154**: 419-428.
- KUO, W.S. y CHAK, K.F. 1996.** Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl Environ Microbiol*, **62**: 1367-1377.
- LAEMMLI, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LAL, S. y TABACCHIONI, S. 2009.** Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian J Microbiol*, **49**: 2-10.
- LAMPEL, J., CANTER, G., DUMOCK, M., KELLY, J., ANDERSON, J. y URATANI, B. 1994.** Integrative cloning, expression and stability of the *cry1A(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Appl Environ Microbiol*, **60**: 501-508.
- LECADET, M.M. y LERECLUS, D. 1984.** Structure and activity of the *B. thuringiensis* δ -endotoxin recent development in genetics. En: *Bacterial protein toxins* (J.E. Alouf, F.J. Fehrenbach, J.H.Y. Freer, J. Jeljascewicz, Eds). Academic Press, London. pp. 147-154.
- LECADET, M.M., FRACHON, E., DUMANOIR, V.C., RIPOUTEAU, H., HAMON, S., LAURENT, P. y THIERY, I. 1999.** Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol*, **88**: 660-672.
- LECHNER, S., MAYR, R., FRANCIS, K.P., PRÜB, B.M., KAPLAN, T., WIEBNER-GUNKEL, E., STEWAR, G.S.A.B. y SCHERER, S. 1998.** *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol*, **48**: 1373-1382.
- LECHUGA, A., EL-SAYED HATEM, A., RAMOS, J.M. y VARGAS-OSUNA, E. 2004.** Comparación de la susceptibilidad de larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) y *Helicoverpa armigera* (Hübner) al Spinosad, un insecticida de origen natural. *Bol San Veg Plagas*, **30**: 573-580.
- LEE, M.K., YOUNG, B.A. y DEAN, D.H. 1995.** Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **216**: 306-312.

- LENIN, K., ASIA MARIAM, M. y UDAYASURIYAN, V. 2001.** Expression of a Cry2Aa gene in an acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* strain and toxicity of Cry2Aa against *Helicoverpa armigera*. *World J Microb Biot*, **17**: 272-278.
- LERECLUS, D., BOURGOUIN, C., LECADDET, M. M., KLIER, A. y RAPOPORT, G. 1989.** Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. En: *Regulation of procaryotic development* (I. Smith, R.A. Slepecky, P. Setlow, Eds). American Society for Microbiology. Washington DC. pp. 255-275.
- LERECLUS, D., DELÉCLUSE, A. y LECADDET, M.M. 1993.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. En: *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide; theory and practice* (P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey y S. Higgs, Eds). John Wiley. Chichester. pp. 37-70.
- LI, B., YU, R., TANG, Q., SU, T., CHEN, X., ZHU, B., WANG, Y., XIE, G. y SUN, G. 2011.** Biofilm formation ability of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* and their inhibitory effect against tomato bacterial wilt. *Afr J Microbiol Res*, **5**: 4260-4266.
- LIN, L., JIN, Z., MA, C., SUN, F., WANG, F., GONG, W., GU, B. y ZHOU, Y. 2010.** Identification and field control efficacy of endophytic bacterial strain Jaas cd against cotton Verticillium wilt. *Jiangsu J Agric Sci*, **01**.
- LINDBERG T. y GRANHAL, U. 1986.** Acetylene reduction in gnotobiotic cultures with rhizosphere bacteria and wheat. *Plant and Soil*, **92**: 171-180.
- LINDOW, S.E. y BRANDL, M.T. 2003.** Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, **69**: 1875-1883.
- LOEB, M.J. 2010.** Factors affecting proliferation and differentiation of lepidopteran midgut stem cells. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **74**: 1-16.
- LOEB, M.J., MARTIN, P.A., HAKIM, R.S., GOTO, S. y TAKEDA, M. 2001.** Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol*, **47**: 599-606.
- LÓPEZ-LARA, P., BENINTENDE, G., COZZI, J., OCHOA-ZARZOSA, A., BAIZABAL-AGUIRRE, V. y VALDEZ-ALARCÓN, J. 2005.** The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. *Plasmid*, **54**: 229-40.

- LÓPEZ-MEZA, J. y IBARRA, J. 1996.** Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, **62**: 1306-1310.
- LUO, K., BANKS, D. y ADANG, M. 1999.** Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 457-464.
- JONES, K.A. y MCKINLEY, D.J. 1986.** UV inactivation of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus in Egypt: assessment and protection. En: *Fundamental and applied aspects of Invertebrate Pathology* (R.A. Samson, J.M. Vlak, D. Peters. Eds). The Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, The Netherlands. p. 155.
- MAAGD, R.A., BRAVO, A., BERRY, C., CRICKMORE, N. y SCHNEPF, H.E. 2003.** Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*, **37**: 409-433.
- MAHILUM, M., LUDWIG, M., MADON, M. y BECKER, N. 2005.** Evaluation of the present dengue situation and control strategies against *Aedes aegypti* in Cebu City, Philippines. *J Vector Ecol*, **30**: 277-283.
- MARTIGNONI, M.E. y IWAI, P.J. 1986.** A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. En: *Microbial control of pests and plant diseases* (H.D. Burges, Ed). Academic Press, London. 897 pp.
- MARTIN, P.A.W. y TRAVERS, R.S. 1989.** Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol*, **55**: 2437-2442.
- MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.C., GOULD, F. y FERRÉ J. 1999.** Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Sci & Tech*, **9**: 239-246.
- MARTINS, E.S., PRAÇA, L.B., DUMAS, V.F., SILVA-WERNECK, J.O., SONE, E.H., WAGA, I.C., BERRY, C. y MONNERAT, R.G., 2007.** Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Biol Control*, **40**: 65-68.

- MAXWELL, E., FADAMIRO, H. y MCLAUGHLIN, J. 2006.** Suppression of *Plutella xylostella* and *Trichoplusia ni* in cole crops with attracticide formulations. *J Econ Entomol.* **99**: 1334-1344.
- McGAUGHEY, W.H. 1985.** Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**: 193-195.
- McPHERSON, S.A., PERLAK, F.J., FUCHS, R.L., MARRONE, P.G., LAVRIK, P. B. y FISCHHOFF, D.A. 1988.** Characterisation of the coleopteran specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biol Technol*, **6**: 61-66.
- MEADOWS, M.P. 1993.** *Bacillus thuringiensis* in the environment-ecology and risk assessment. En: *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide; theory and practice* (P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs, Eds). Chichester, John Wiley. pp. 193-220.
- MEADOWS M.P., ELLIS D.J., JARRET P. y BURGESS H.D. 1992.** Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl Environ Microbiol*, **58**: 1344-1350.
- MENDIZÁBAL, M. 1940.** Dos nuevas plagas de nuestros cultivos meridionales: *Prodenia litura* y *Euprepocnemis plorans* Charp. (Ort. Acr.). *Bol Pat Veg Entomol Agríc*, **9**.
- MÉNDEZ-LÓPEZ, I., BASURTO-RÍOS, R. y IBARRA, J.E. 2003.** *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiol Lett*, **226**: 73-77.
- MENTABERRY, A. 2011.** *Resistencia a insectos y nematodos* (presentación de Agrobiotecnología). Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- METALNIKOV, S. y CORINE, V. 1929.** On the infection of the gypsy moth and other insects with *Bacterium thuringiensis*. A preliminary report. *Int Corn Borer Invest Soc Rep*, **2**: 60-61.
- MOREAU, G. y BAUCE, E. 2003.** Lethal and sublethal effects of single and double applications of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *J Econ Entomol*, **96**: 280-286.
- MOUSSA, M.A., ZAHER, M.A. y KOTBY, F. 1960.** Abundance of the cotton leaf worm, *Prodenia litura* (F.), in relation to host plants. I. Host plants and their effect on biology (Lepidoptera: Agrotidae. Zenobiinae). *Bull Soc Entomol Egypte*, **44**: 241-245.

- MULLER-COHN, J., CHAUFaux, J., BUISSON, C., GILOIS, N., SANCHIS, V. y LERECLUS, D. 1996. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Cry1C and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. *J Econ Entomol*, **89**: 791-797.
- NAKAMURA, L.K. 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp.nov. *Int J Syst Bacteriol*, **48**: 1031-1035.
- NAVON, A. 1993. Control of Lepidoptera pests with *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticides; theory and practice* (P.F. Enswite, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higga, Eds). Chichester, John Wiley. pp. 124-146.
- NAVON, A., NAGALAKSHMI, V.K., SHLOMIT-LEVSKI, SALAME, L. y GLAZER, I. 2002. Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopterous pests. *Biocontrol Sci Technol*, **12**: 737-746.
- NYOKI, F.F.R., FUXA, J.R. y RICHTER, A.R. 1996. Spore-toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Entomol Sci*, **31**: 52-62.
- OBUKOWICZ, M.G., PERLACK, F.J., KUSANO-KRETZMER, K., MEYER, E.J. y WATRUD, L.S. 1986. Integration of the delta endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root colonizing strains of pseudomonads using Tn5. *Gene*, **45**: 327-331.
- OGIWARA, K., INDRASITH, L.S., ASANO, S. y HORI, H. 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J Invertebr Pathol*, **60**: 121-126.
- OHBA, M. y AIZAWA, K. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J Invertebr Pathol*. **32**: 303-309.
- OPPERT, B., KRAMER, K.J., BEEMAN, R.W., JOHNSON, D. y MCGAUGHEY, W.H. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem*, **272**: 23473-23476.
- PAGE, A.L., MILLAR, R.H. y KEENY, D.R. 1982. *Methods of soil analysis*. American Agriculture Inc. Madison. 1159 pp.
- PETERSEN D.J., SRINIVASAN, M. y CHANWAY, C.P. 1996. *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. *FEMS Microbiol Letters*, **142**: 271- 276.

- POITOUT, S. y BUES, R. 1974.** Élevage de chenilles de vingt-huit espèces de lépidoptères Noctuidae et de deux espèces d'Arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces. *Ann Zool Écol Anim*, **6**: 431-441.
- PORCAR, M. y JUÁREZ-PÉREZ, V. 2003.** PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev*, **26**: 419-32.
- PROMDONKOY, B., RUNGROD, A., PROMDONKOY, P., PATHAICHINDACHOTE, W., KRITTANAI, C. y PANYIM, S. 2008.** Amino acid substitutions in alphaA and alphaC of Cyt2Aa2 alter hemolytic activity and mosquito-larvicidal specificity. *J Biotechnol*, **133**: 287-293.
- RAHARDHA, V. y WHALON, M.E. 1995.** Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Cry IIIA δ -endotoxin in Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol*, **88**: 21-26.
- RAHMAN, M., GLATZ, R., ROUSH, R. y SCHMIDT, O. 2011.** Developmental penalties associated with inducible tolerance in *Helicoverpa armigera* to insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, **77**: 1443-1448.
- RAMOS GUTIÉRREZ, J., ORTIZ, J.F. y VARGAS-OSUNA, E. 2004.** Susceptibilidad de larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) y *Earias insulana* (Boisduval) (Lepidoptera:Noctuidae) a la delta-endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Bol San Veg Plagas*, **30**: 239-245.
- RAVI, A.V., MUSTHAF, K.S., JEGATHAMMAL, G., KATHIRESAN, K., y PANDIAN, S.K. 2007.** Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. *Lett Appl Microbiol*, **45**: 219-223.
- RAZA, W., YANG, W. y SHEN, Q.R. 2008.** *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. *J Plant Pathol*, **90**: 419-430.
- REGEV, A., KELLER, M., STRIZHOV, N., SNEH, B., PRUDOVSKY, E. y CHET, I. 1996.** Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *S. littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol*, **62**: 3581-3586.
- RIBBE, C. 1909-1912.** Beiträge zu einer Lepidopteren-Fauna von Andalusien (Süd-Spanien). Makrolepidopteren. *Dt ent Z Iris*, **23**: 1-395.
- SALAMA, H.S.; FODA, M.S.; EL-SHARDY, A.; MATTER, M. y KHALAFALLAH,**

- M. 1981.** Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal level of endotoxins of *Bacillus thuringensis* for different periods. *J Invert Pathol*, **38**: 220-229.
- SALAMA, H.S.; ZAKI, F.M. y SHARABY, A.F. 1982.** Effect of *Bacillus thuringiensis* Berl. on parasites and predators of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *J Appl Entomol*, **94**: 498-504.
- SALEHI JOUZANI, G., POURJAN ABAD, A., SEIFINEJAD, A., MARZBAN, R., KARIMAN, K. y MALEKI, B. 2008.** Distribution and diversity of dipteran specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **35**: 83-94.
- SALEM, S.A. y MATTER, M.M. 1991.** Relative effects of neem seed oil and Deenate on the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* Boisid, and the most prevalent predators in cotton fields at Menoufyia Governorate. *Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo*, **42** (3, Suppl.): 941-952.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANCHIS, V. y BOURGUET, D. 2008.** *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. *A rev Agron Sustain Dev*, **28**: 11-20.
- SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 1977.** *Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayos de baculovirus*. Fundación Juan March. Serie Universitaria, N° 43. 99 pp.
- SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 1991.** The knowledge fungal entomopathogens in Spain. *IOBC/WPRS. Bull.*, **XIV/7**: 85-89.
- SAUKA D. 2007.** Estudio de genes y proteínas insecticidas de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Aportes al conocimiento de su distribución y toxicidad en plagas agrícolas. Tesis Doctoral. UBA.
- SAUKA, D.H. y BENINTENDE, G.B. 2008.** *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, **40**: 124-140.
- SAYYED, A.H., CRICKMORE, N. y WRIGHT, D.J. 2001.** Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 5859-5861.

- SCHNEPF, H.E. y WHITELEY, H.R. 1981.** Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**: 2893-2897.
- 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 Res*, **62**: 775-806.
- SHAMSELDEAN, M.M., ABD-ELGAWAD, M.M. y ATWA, A.A. 1998.** Effect of soil temperature, exposure time and host introduction on pathogenicity and recycling of *Heterorhabditis bacteriophora* strain EASD98 and its comparison with *H. bacteriophora* strain HP88 and *Steinernema riobravae* from USA. *Int J Nematol*, **8**: 71-76.
- SHAMSELDEAN, M.M., ABD-ELGAWAD, M.M. y ATWA, A.A. 1999.** Factors affecting pathogenicity of an Egyptian strain of *Heterorhabditis indicus* infecting cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Int J Nematol*, **9**: 90-94.
- SHELTON, A.M., ROBERTSON, J.L., TANG, J.D., PEREZ, C., EIGENBRODE, S.D., PREISLER, H.K. y COOLEY, R.J. 1993.** Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *J Econ Entomol*, **86**: 697-705.
- SHISHIDO M., MASSICOTTE, H.B. y CHANWAY, C.P. 1996.** Effect of plant growth promoting *Bacillus* strains on pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection. *Annals of Botany*, **77**: 433-441.
- SMITH, R.A. y COUCHE, G.A. 1991.** The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl Environ Microbiol*, **57**: 311-315.
- SNEATH, P.H.A. 1986.** Sporeforming gram-positive rods and cocci. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology* (J.P. Butler, Ed). Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 1104-127.
- SOLIMAN, A.A., AFIFY, A.M., ABDEL RAHMAN, H.A. y ATWA, W.A. 1970.** Effect of *Bacillus thuringiensis* of the biological potency of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *J Appl Entomol*, **66**: 399-403.
- SOMASEGARAN, P. y HOBEN, H. 1985.** Methods in legume *Rhizobium* technology. University of Hawai. Niftal Project and Mircen. Hawai, 367 pp.
- SONDOS, M.A., BADR, N.A. y EL-HAFEZ, A.A. 2000.** Efficacy of two formulations of pathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* against the first instar larvae of *Spodoptera*

littoralis (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hfn.) (Lepidoptera-Noctuidae). *Egyptian J Agric Res*, **78**: 1025-1040.

STOCK, C., MCLOUGHLIN, T., KLEIN, J. y ADANG, M. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepacia* 526. *Can J Microbiol*, **396**: 879-84.

SUDHA, S.N., JAYAKUMAR, R. y VAITHILINGAM, S. 1999. Introduction and expression of the *cry1Ac* gene of *Bacillus thuringiensis* in a cereal-associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. *Curr Microbiol*, **38**: 163-167.

STEWART, G.S.A.B., JOHNSTONE, K., HAGELBERG, E. y ELLAR, D.J. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochem J*, **198**: 101-106.

TABASHNIK, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, **39**: 47-79.

TABASHNIK, B.E. 1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, **94**: 3488-3490.

TABASHNIK, B.E., CUSHING, N.L., FINSON, N. y JOHNSON, M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J Econ Entomol*, **83**: 1671-1676.

TABASHNIK, B.E., FINSON, N., GREOTERS, 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 Nat Acad Sci USA*, **91**: 4120-4124.

TABASHNIK, B.E., LIU, Y.B., FINSON, N., MASSON, L. y HECKEL, D.G. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc Natn Acad Sci USA*, **94**: 1640-1644.

TAMEZ-GUERRA, P., MCGUIRE, M.R., BEHLE, R.W., SHASHA, B.S. y WONG, L.J. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol*, **93**: 219-225.

THAMTHIANKUL, S., MOAR, W., MILLER, M. y PANBANGRED, W. 2004. Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, **65**: 183-92.

- THEODULOZ, C., VEGA, A., SALAZAR, M., GONZÁLEZ, E. y MEZA-BASSO, L. 2003.** Expression of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin *cry1Ab* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). *J Appl Microbiol*, **94**: 375-381.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. y GIBSON, T.J. 1994.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res*, **22**: 4673-4680.
- TIEDJE, J., COLWELL, R., GROSSMAN, Y., HODSON, R., LENSKI, R. y MACK, R. 1989.** The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*, **70**: 298-315.
- TIMMUSK, S., NICANDER, B., GRANHALL, U. y TILLBERG, E. 1999.** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem*, **31**: 1847-1852.
- TIMMUSK, S., GRANTCHAROVA, N., GERHART, E. y WAGNER, H. 2005.** *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl Environ Microb*, **71**: 7292-7300.
- TRAVERS, R.S., MARTIN, P.A.W. y REICHELDERFER, C.F. 1987.** Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. *Appl Environ Microbiol*, **53**: 1263-1266.
- TRÜPER, H.G. 2005.** The type species of the genus *Paenibacillus* Ash et al. 1994 is *Paenibacillus polymyxa*. Opinion 77 judicial commission of the international committee on systematics of prokaryotes correspondence. *Int J Syst Evol Micr*, **55**: 513.
- TURNER, J.T., LAMPEL, J.S., STEARMEN, R.S., SUNDIN, G.W., GUNYUZUL, P. y ANDERSON, J.J. 1991.** Stability of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xily* subsp. *cynodontis*. *Appl Environ Microbiol*, **57**: 3522-3528.
- URIBE, D., MARTÍNEZ, W. y CERÓN, J. 2003.** Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol*, **82**: 119-27.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. 2009.** Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol*, **101**: 1-16.

- VAN FRANKENHUYZEN, K. 1993.** The challenge of *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide; theory and practice* (P.F. Enswite, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higga, Eds). Chichester, John Wiley. pp. 1-35.
- VAN FRANKENHUYZEN, K., GRINGORTEN, J.L., GAUTHIER, D., MILNE, R.E., MASSON, L. y PEFEROEN, M. 1993.** Toxicity of activated Cry1 proteins from *Bacillus thuringiensis* to six forest Lepidoptera and *Bombyx mori*. *J Invertebr Pathol*, **62**: 295-301.
- VAN RIE, J. y FERRÉ, J. 2000.** Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. En: *Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field applications* (J.F. Charles, A. Delecluse, C. Nielsen-LeRoux, Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrcht, The Netherlands. pp. 219-237.
- VARGAS-OSUNA, E. 1985.** La reproducción de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) y sus alteraciones por el virus de la poliedrosis nuclear (VPN) (Baculoviridae: Baculovirus). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 175 pp.
- VARGAS-OSUNA, E. y SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 1988.** Differential response of male and female *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lep.: Noctuidae) individuals to a nuclear polyhedrosis virus. *J Appl Entomol*, **105**: 374-378.
- VASAN, S.S., MODAK, J.M. y NATARAJAN, K.A. 2001.** Some recent advances in the bioprocessing of bauxite. *Int J Miner Process*, **62**: 173-186.
- VÁSQUEZ, M., PARRA, C., HUBERT, E., ESPINOZA, P., THEODULOZ, C. y MEZA BASSO, L. 1995.** Specificity and insecticidal activity of Chilean strains of *Bacillus thuringiensis*. *J Invert Pathol*, **66**: 143-148.
- VIDAL QUIST, J.C. 2010** Estrategias para la utilización de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner) en el control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia.
- VILLANUEVA, M.J.C., MUNIZ, B.G. y TAMES, R.S. 1985.** Effects of glyphosate on growth and the chlorophyll and carotenoid levels of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). *Weed Sci*, **33**:751-754.
- WAALWIJK, C., DULLEMANS, A. y MAAT, C. 1991.** Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol Lett*, **77**: 257-264.
- WASANO, N., YASUNAGA-AOKI, C., SATO, R., OHBA, M., KAWARABATA, T. y IWAHANA, H. 2000.** Spherical parasporal inclusions of the lepidoptera-specific and

coleopteraspecific *Bacillus thuringiensis* strains: a comparative electron microscopic study. *Curr Microbiol*, **40**: 128-131.

WENE, G.P. y SHEET, L.W. 1961. Control of the beet armyworm on cotton in Arizona. *J Econ Entomol*, **54**: 192-193.

WHIPPS, J.M., HAND, P., PINK, D. y BENDING, GD. 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol*, **105**: 1744–1755.

WILSON, G.R. y BENOIT, T.G. 1993. Alkaline pH activates *Bacillus thuringiensis* spores. *J Inverteb Pathol*, **62**: 87-89.

YAMAMOTO, T. y DEAN, D.H. 2000. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. En: *Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field applications* (J.F. Charles, A. Delecluse, C. Nielsen-LeRoux, Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrch, The Netherlands. pp. 81-100.

YANG, C.L.; YEN, D.F. y HSU, E.L. 1985. Secondary effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to larvae of *Spodoptera litura*. *Chin J Entomol*, **5**: 19-21.

ZARA, G., ZARA, S., MANGIA, N.P., GARAU, G., PINNA, C.L.G. y BUDRONI, M. 2006. PCR methods to discriminate *Bacillus thuringiensis* strains. *Ann Microb*, **56**: 71-76.

ZENGGUO, H., KISLA, D., ZHANG, L., YUAN, C., GREEN-CHURCH, K.B. y YOUSEF, A.E. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel antibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microb*, **73**: 168-178.

ZHANG, J., HODGMAN, T.C., KRIEGER, L., SCHNETTER, W. y SCHAIRER, H.U. 1997. Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae*. *J Bacteriol*, **179**: 4336-4341.

ZHANG, X., CANDAS, M., GRIKO, N., TAUSSIG, R. y BULLA, L. Jr. 2006. Mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 9897-9902.

ZHANG, X., GRIKO, N., CORONA, S. y BULLA, L.J.R. 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **149**: 581-588.

ZHU, C., RUAN, L., PENG, D., YU, Z. y SUN, M. 2006. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. *Lett Appl Microbiol*, **42**: 109-14.