



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ACARICIDA DE UN BIOPRODUCTO A  
BASE DE *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* CONTRA *Tetranychus urticae*  
PRESENTE EN CULTIVOS DE ROSA EN EL CANTÓN RUMIÑAHUI,  
PROVINCIA DE PICHINCHA.

Autora

Doménica Elizabeth López Lucero

Año  
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ACARICIDA DE UN BIOPRODUCTO A  
BASE DE *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* CONTRA *Tetranychus urticae*  
PRESENTE EN CULTIVOS DE ROSA EN EL CANTÓN RUMIÑAHUI,  
PROVINCIA DE PICHINCHA.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M. Sc. Wilson David Tapia López

Autora

Doménica Elizabeth López Lucero

Año

2019

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación *in vitro* del efecto acaricida de un bioproducto a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* contra *Tetranychus urticae* presente en cultivos de rosa en el cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, a través de reuniones periódicas con la estudiante Doménica Elizabeth López Lucero, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Wilson David Tapia López  
Máster en Ciencias de Gestión y Planificación Ambiental  
CI: 1714205281

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado el trabajo, Evaluación *in vitro* del efecto acaricida de un bioproducto a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* contra *Tetranychus urticae* presente en cultivos de rosa en el cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, de la estudiante Doménica Elizabeth López Lucero en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Fernando Xavier Rivas Romero  
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas  
CI: 1718092701

## DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente a la estudiante Doménica Elizabeth López Lucero, para la realización de su trabajo experimental de titulación, Evaluación *in vitro* del efecto acaricida de un bioproducto a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* contra *Tetranychus urticae* presente en cultivos de rosa en el cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

---

Francisco Javier Flores Flor  
Doctor en fitopatología  
CI: 1713443479

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Doménica Elizabeth López Lucero  
CI: 1717539140

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por bendecirme con fuerza; a mis padres, Santiago y Marcela por el apoyo, la comprensión y el impulso que me han brindado siempre, los amo mucho. A todos mis amigos y familia por nunca dejarme sola. Agradezco a IDgen por abrirme las puertas como tesista, en especial al doctor Francisco Flores, por otorgarme la oportunidad de realizar este trabajo, por confiar en mí y ser un gran mentor y ejemplo como profesional y como persona. Al profesor Wilson Tapia, por su guía y motivación durante este proceso. A Ale por enseñarme, orientarme y aconsejarme; en verdad lo aprecio, y a Fiama por su compañía y ayuda.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi hermano Pablo, gracias por llenarme de alegría y orgullo. Tu existencia me marcó la vida. Te amo, sigue siempre tus sueños; y también a mi abuela Yolanda, gracias por demostrarme que el esfuerzo y el sacrificio tienen su recompensa, te amo grandma.



## RESUMEN

Las rosas son las plantas ornamentales de mayor producción y área cosechada en Ecuador, siendo su exportación una importante fuente de recursos. Este cultivo es vulnerable a la plaga conocida como ácaro rojo (*Tetranychus urticae*), artrópodo que provoca un deterioro general en la planta, clorosis y marchitez, entre otros síntomas. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria reconocida por producir toxinas insecticidas, y es utilizada mundialmente como un biocontrolador de coleópteros, dípteros y lepidópteros. En el presente estudio, se llevó a cabo la evaluación del efecto acaricida de un bioproducto de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* contra una población de *T. urticae* presente en rosas en el cantón Rumiñahui en condiciones *in vitro*. Se realizaron los análisis de concentración y pureza del bioproducto, donde se determinaron valores de  $1,03 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup> y 99%, respectivamente. Posteriormente, se realizaron bioensayos, donde se probaron tres concentraciones del bioproducto: 5, 10 y 20 g L<sup>-1</sup> en los estadíos de larva, protoninfa y adulto. Se determinó que 5 g L<sup>-1</sup> fue la dosis más adecuada, por ser la menor concentración capaz de conservar la actividad acaricida en la misma proporción que el resto de dosis, y se confirmó que los estadíos más vulnerables (mortalidad) al bioproducto fueron los de larva (80,66%) y protoninfa (68,54%); en contraste con los controles (8,02 y 23,61%, respectivamente). Por otro lado, se observó que los huevos y adultos del ácaro no son susceptibles al microorganismo, dado que los porcentajes de eclosión e inhibición de eclosión de huevos no variaron con respecto al control; y que la mortalidad en adultos tampoco presentó cambios. Sin embargo, en los adultos se observó una disminución significativa en el índice de actividad de ovoposición; reconociéndose a este como un efecto subletal. Además, se detectaron los genes Cry 1Ba2, Cry 2Aa y Cry 4A en la bacteria a través de PCR y secuenciación, confirmando su potencial entomopatígeno. Los resultados obtenidos comprueban que *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* posee un efecto larvicida y ninficida para *T. urticae* en condiciones *in vitro*, por tanto, posee un potencial para ser usado en programas de manejo integrado de plagas.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, *Tetranychus urticae*, biocontrol, rosas.

## ABSTRACT

The roses are the ornamental plants of greater production and harvested area in Ecuador, being its export an important source of income. This crop is vulnerable to the plague known as red mite (*Tetranychus urticae*), arthropod that causes a general deterioration in the plant, chlorosis and wilt, among other symptoms. *Bacillus thuringiensis*, is a bacteria recognized for producing insecticidal toxins, and is used worldwide as a biocontroller of Coleoptera, Diptera and Lepidoptera. In the present study, the evaluation of the acaricidal effect of a bioproduct of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* against a population of *T. urticae* present in roses of the Rumiñahui canton under *in vitro* conditions was performed. The analysis of concentration and purity of the bioproduct were carried out, where values of  $1.03 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> and 99%, respectively, were determined. Subsequently, bioassays were conducted, where three concentrations of the bioproduct were tested: 5, 10 and 20 g L<sup>-1</sup> in the stages of larvae, protonymph and adult. It was determined that 5 g L<sup>-1</sup> was the most adequate dose, as it was the lowest concentration able to preserve the acaricidal activity in the same proportion as the rest of the doses, and it was confirmed that the most vulnerable stages (mortality) to the bioproduct were the larval (80.66%) and protonymphal (68.54%); in contrast to the controls (8.02 and 23.61%, respectively). On the other hand, it was observed that the eggs and adults of the mite are not susceptible to the microorganism, given that the percentages of hatching and inhibition of hatching of eggs did not vary with respect to the control; and that mortality in adults did not change either. However, in adults there was a significant decrease in the oviposition activity index; recognizing this as a sublethal effect. In addition, the Cry 1Ba2, Cry 2Aa and Cry 4A genes were detected in the bacteria through PCR and sequencing, confirming their entomopathogenic potential. The results obtained prove that *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* has a larvicidal and nymphicidal effect for *T. urticae* under *in vitro* conditions, therefore, it has a potential to be used in integrated pest management programs.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, *Tetranychus urticae*, biocontrol, roses.

## ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general .....	5
1.3.2. Objetivos Específicos: .....	5
1.4. Justificación de la investigación .....	6
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. El cultivo de rosa en el Ecuador .....	8
2.2. Generalidades de <i>Tetranychus urticae</i> .....	9
2.3. Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	11
2.3.1. División celular.....	12
2.3.2. Esporulación.....	12
2.3.3. Estructura y mecanismo de acción de las proteínas Cry .....	13
2.3.4. Otras toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS.....	18
3.1. Material de experimentación .....	18
3.2. Determinación de concentración y pureza del bioproducto.....	19
3.3. Tratamientos y variables de estudio .....	20
3.3.1. Efecto ovicida y larvicida de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> .....	22
3.3.2. Efecto ninficida de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> .....	23
3.3.3. Efecto de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> en adultos y su ovoposición.....	24
3.4. Extracción de ADN, electroforesis y PCR de genes Cry .....	25

3.5. Evaluación estadística de los resultados .....	27
3.6. Diagrama de flujo del desarrollo del estudio.....	28
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
4.1. Determinación de pureza y concentración.....	28
4.2. Efecto de <i>B.thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> en eclosión e inhibición de eclosión .....	29
4.3. Capacidad larvicida y ninficida de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> .....	31
4.4. Detección de genes Cry en Bacillus thuringiensis y su relación con efecto acaricida en adultos.....	35
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	39
5.1. Conclusiones.....	39
5.2. Recomendaciones .....	39
REFERENCIAS .....	41
ANEXOS .....	50

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

El manejo de plagas y agentes patógenos en los cultivos ha sido una actividad trascendental en el desarrollo del sector agrícola debido a las pérdidas masivas en producción y rendimiento que se pueden presentar cuando estas no pueden ser controladas. Para este fin, se han ido estudiando varias alternativas ambientalmente amigables, y en la actualidad se ha incentivado la aplicación del control biológico o biocontrol, el cual consiste en la utilización de enemigos naturales como los microorganismos o sus metabolitos secundarios con el propósito de minimizar el daño ocasionado por patógenos en los cultivos, evitando una afectación de elevada proporción en términos de calidad y rendimiento del cultivo (Sree & Varma, 2015).

Se han utilizado depredadores y enemigos naturales para el control de plagas en la agricultura desde hace siglos, siendo uno de los primeros datos de la aplicación del biocontrol, el empleo de las hormigas de la especie *Oecophylla smaragdina* en cultivos de árboles cítricos en China, para manejar a la plaga *Tessarotoma papillosa* en el año 1200. Sin embargo, el concepto de biocontrol se formalizó en el siglo XIX como resultado de los descubrimientos realizados con respecto a las interacciones entre especies, evolución y los graves problemas presentados en diversos lugares del mundo debido a la inmigración de plagas (Huffaker, 1976).

El inicio en el estudio de la entomopatología se llevó a cabo en 1826 por Kirby y Spence. En 1835, Agostino Bassi realizó estudios que demostraron por primera vez que el hongo *Bauveria bassiana* era el agente causal de una infección letal en el gusano de seda; y a partir de este descubrimiento, Bassi fue el primer investigador en sugerir el uso de este tipo de microorganismos contra insectos perjudiciales (Prokopy & Kogan, 2009). A raíz de esto, se han descubierto un gran número de microorganismos con capacidad

biocontroladora, entre los cuales se destacan las bacterias entomopatógenas, las mismas que poseen un espectro vasto de toxinas y compuestos con efectos insecticida; entre dichas bacterias se encuentran *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Brevibacillus laterosporus* y *Bacillus thuringiensis* (Chakroun, Banyuls, Bel, Escriche, & Ferré, 2016).

La bacteria esporuladora *Bacillus thuringiensis* fue reportada por primera vez en el año 1901 por Ishiwata, quien registró la infección del microorganismo en el gusano de seda, *Bombyx mori* (Melo, Soccol, & Soccol, 2016). Posteriormente, en 1911 el investigador alemán Ernst Berliner aisló al microorganismo patógeno que provocaba la infección de la polilla *Anagasta kuehniella*, considerada una plaga grave en el estado de Thüringen, y al microorganismo aislado lo denominó *Bacillus thuringiensis* (Huffaker, 1976). Esta bacteria es gram-positiva y aerobia, con una capacidad entomopatógena inherente, debido a las toxinas que posee. Se han logrado identificar 952 genes de toxinas de naturaleza proteica que pueden presentar las diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* provenientes de diversas partes del mundo (Jouzani, Valijanlian, & Sharafi, 2017). Dichas toxinas por lo general, se presentan como inclusiones paraesporales generadas simultáneamente a la esporulación de la bacteria durante su fase estacionaria.

La capacidad de *Bacillus thuringiensis* para controlar una variada gama de plagas de acuerdo a la cepa y sus combinaciones de toxinas, ha sido motivo para que se lo emplee en la elaboración de muchos insecticidas fabricados tanto a base de la propia bacteria como de sus cristales y esporas. En el mercado ya se han registrado oficialmente 123 biopesticidas derivados de *B.thuringiensis* (De Maagd, 2015). En adición a esto, la ingeniería genética ha hecho posible la inserción de los genes codificantes de proteínas Cry y Vip a varias plantas de gran importancia económica con el fin de generar resistencia a plagas en las mismas (plantas Bt). En 2015, se reportaron 18 millones de hectáreas sembradas con cultivos Bt de tomate, maíz, soya, arroz, papa, berenjena y algodón (Jouzani, Valijanlian, & Sharafi, 2017).

## 1.2. Planteamiento del problema

Muchas de las estrategias para el control del ácaro rojo han sido obstaculizadas por varios motivos, tales como los efectos negativos de la aplicación excesiva de los pesticidas químicos empleados, hacia los humanos, el medio ambiente y en la cadena trófica. Se ha verificado que muchos de los compuestos químicos que poseen los pesticidas son agentes mutágenos; en estudios de aberraciones cromosómicas en humanos, se confirmó que individuos que fueron expuestos frecuentemente a altas cantidades de plaguicidas mostraron una mayor probabilidad de adquirir daño genético irreversible por la saturación de los sistemas de reparación de ADN en las células; lo que implica un mayor riesgo de padecer cáncer (López, 2012). De igual manera, en un estudio se examinó que la exposición prolongada a insecticidas organofosforados generó un aumento en deleciones, translocaciones y ruptura de cromátidas (Bolognesi, 2003).

En investigaciones de agroquímicos hechos a base de compuestos endocrino-disruptores, se confirmó que las mujeres expuestas a dosis elevadas del pesticida dietilestilbestrol, presentaron anomalías en el tracto uterino y una gran disminución de su fertilidad, además de una tasa más elevada de partos prematuros y embarazos ectópicos (Gilden, Huffling, & Sattler, 2010). En adición a esto, existe evidencia toxicológica y bioquímica que avala los efectos negativos de los agroquímicos a nivel neuronal, pues ciertos pesticidas se han visto involucrados en el desarrollo de enfermedades como el Parkinson (Moretto & Colosio, 2011).

El medio ambiente, de igual manera suele verse afectado por el uso de pesticidas. En el suelo, los plaguicidas poseen la capacidad de ser retenidos de acuerdo a sus propiedades químicas y a sus interacciones con dicho componente. Los pesticidas hidrofóbicos, por ejemplo, se retienen en mayor grado en comparación a los compuestos polares y también son bioacumulables, lo que promueve la erosión y el desgaste (Damalas &

Eleftherohorinos, 2011). De acuerdo a las propiedades químicas de los pesticidas, se debe recurrir a otras técnicas para que estos puedan ser liberados del suelo. Para los pesticidas polares, se suelen aplicar lavados; lo que implica problemas en la calidad de agua a largo plazo, ya que la lixiviación de agroquímicos polares involucra la afectación y posible contaminación de los acuíferos (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009).

Las repercusiones que existen en base a la contaminación del agua por pesticidas han sido monitoreadas detenidamente en las últimas décadas. Los impactos en la calidad e inocuidad del agua ocasionados por los compuestos activos de los pesticidas se basan en la bioaumentación y la bioacumulación. Los pesticidas disueltos que llegan a formar parte de los cuerpos de agua pasan a incorporarse en el ciclo hidrológico, haciendo que estos compuestos se integren en acuíferos superficiales o aguas subterráneas (Agrawal, Pandey & Sharma, 2010). Por esto, los sistemas ecológicos acuáticos se ven afectados de manera directa o indirecta por los plaguicidas dependiendo de la magnitud y duración de la exposición. Se han podido apreciar cambios en las dinámicas de comunidades acuáticas debido a la pérdida de especies vulnerables a pesticidas (Lorenz, 2017).

Los acaricidas químicos pueden tener repercusiones no únicamente en las plagas, sino también en otros organismos como los enemigos naturales de las mismas. En los estudios que se han realizado a los pesticidas químicos en las últimas décadas, se ha establecido que existe una afectación de la cadena alimenticia de controladores biológicos de insectos y artrópodos en el tercer nivel trófico (Rusch, Valantin-Morison, Sarthou, & Roger-Estrade, 2010). Se ha probado que los pesticidas químicos favorecen una pérdida en la cantidad de predadores y parasitoides naturales de insectos y artrópodos, dando lugar a la posibilidad de que broten plagas secundarias o que resurjan plagas mitigadas (Felsot & Rack, 2006). Por otro lado, otros estudios han señalado que puede existir un cambio en el comportamiento de parasitoides dado al uso de pesticidas; pues un análisis de dosis letales y subletales de plaguicidas como la



deltametrina en el parasitoide *T. basalis* se observó que el tiempo de residencia del parasitoide en su hospedador era significativamente menor al estar expuesto a dicho plaguicida, aludiendo a que la capacidad de control del parasitoide hacia la plaga podría ser mermada (Salerno, Colazza & Conti, 2002). Se ha podido presenciar deterioro en las poblaciones de fauna auxiliar nativa de sírfidos, arañas, estafilínidos y carábidos por el uso de agroquímicos, puesto que, si las cantidades de plaguicidas a las que parasitoides, fauna auxiliar y depredadores se encuentran expuestos son subletales, existe el riesgo de que estas especies se extingan; si es que estas no tienen ciclos de vida cortos o altas tasas poblacionales, ya que los efectos de la subletalidad se traducen en impactos severos en las tasas de reproducción y supervivencia (Biondi, Zappalà, Stark, & Desneux, 2013).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto insecticida de un bioproducto a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* contra *Tetranychus urticae* presente en cultivos de rosas del cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos:**

- ❖ Determinar la calidad y pureza del bioproducto a base de *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*.
- ❖ Establecer la dosis de bioproducto adecuada para el control de *Tetranychus urticae* *in vitro*.
- ❖ Determinar el efecto acaricida *in vitro* de la bacteria en las diferentes etapas de ciclo de vida del ácaro rojo.

#### 1.4. Justificación de la investigación

Dichos efectos derivados del exceso en el uso de pesticidas químicos, han generado la necesidad de buscar estrategias de control biológico de ácaros más amigables con el ambiente y seguras para el ser humano. El cuidado apropiado de las plantaciones comerciales incluye la implementación de estrategias de manejo integrado de plagas para optimizar el cuidado de los cultivos. En este tipo de estrategias el biocontrol juega un papel crucial debido a las ventajas que presenta en comparación con los pesticidas químicos. Uno de los principales beneficios de la utilización de productos a base de *Bacillus thuringiensis* es la seguridad que provee a la salud humana; ya que no se ha demostrado la presencia de reacciones alérgicas o toxicidad asociadas a esta bacteria, que pueda representar riesgos, o reacciones adversas a largo plazo (De Maagd, 2015). Por otra parte, se sabe que los bioproductos basados en esta bacteria o sus metabolitos secundarios son biodegradables, lo que los hace amigables con el medio ambiente (Sanahuja, Banakar, Twyman, Capell, & Christou, 2011). Los bioproductos de *B.thuringiensis* tienen como último beneficio el no generar impactos negativos en poblaciones de organismos que no son objetivos del plan de manejo de plagas. Esto se afirma gracias a los extensos estudios donde se han desarrollado sistemas tritróficos comprendidos por plantas, fitófagos y depredadores naturales, mostrando que los depredadores naturales que no son objetivo del tratamiento no son perjudicados, y al mismo tiempo tampoco se han identificado efectos deletéreos en parasitoides, polinizadores o mariposas (Yu, Li, & Wu, 2011).

Dentro del biocontrol del ácaro rojo, es necesario resaltar los limitados estudios de susceptibilidad de *Tetranychus urticae* en exposición directa a *Bacillus thuringiensis*, puesto que mayoritariamente se ha documentado el efecto de ciertas proteínas Cry expresadas en cultivos transgénicos (cultivos Bt) con respecto al desarrollo, fertilidad y tiempo de vida del ácaro rojo. Un estudio en China, comprobó que en plantaciones de algodón Bt que expresaban proteínas Cry1Ac/Cry2Ab, el ácaro rojo no mostraba incrementos en mortalidad, ni

modificaciones fisiológicas o de desarrollo (Guo, 2016). Así mismo, en otros estudios llevados a cabo en Suiza se comprobó que la proteína Cry3Bb1 expresada en maíz Bt no ocasionó ningún daño a *Tetranychus urticae*, o cambios en sus parámetros de ciclo de vida (Li & Romeis, 2010). En contraste, en ensayos ejecutados en la universidad de Ohio, se dio a conocer que la biomolécula *thuringiensin*, sintetizada por *Bacillus thuringiensis* ha presentado resultados favorables en el control de la plaga a través de la disminución de fecundidad y alimentación de especímenes adultos de *Tetranychus urticae* (Royalty, R. Hall, Taylor, 1990). Esto se verificó posteriormente en estudios en Chile, donde se observó incrementos en las tasas de letalidad de los ácaros en sus diferentes estadios al estar expuestos directamente a *thuringiensin* o a sus residuos (Vargas, Chapman, & Penman, 2001) Sin embargo, hay escasa información de acuerdo a la vulnerabilidad del ácaro frente a otras biomoléculas acaricidas como las proteínas Cyt y Cry de *Bacillus thuringiensis*, así como existen pocos estudios relacionados al efecto sinérgico que estas pueden tener para generar vulnerabilidad en la plaga. Adicionalmente, sólo se han registrado los experimentos de biocontrol con pocas variedades de esta bacteria, como *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Chapman & Hoy, 1991).

Debido a la amenaza de *Tetranychus urticae* a los cultivos de *Rosa* sp. en fincas en el cantón Rumiñahui, en la provincia de Pichincha, se implementó una estrategia de control biológico, empleando un bioproducto a base de la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Debido a que el control de la plaga no ha podido mantenerse constante en las producciones florícolas, presentando variabilidad en la susceptibilidad de la población de ácaros en cortos períodos de tiempo, se propone en el presente trabajo llevar a cabo un estudio *in vitro*, con el fin de comprobar si el bioproducto posee una actividad acaricida en las diferentes etapas de vida del ácaro.

Con este trabajo se busca probar la capacidad acaricida *in vitro* de un bioproducto de *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* en las diferentes etapas de desarrollo del ácaro rojo, con el objetivo de definir la dosis más adecuada

del biocontrolador y los estadíos de la plaga más vulnerables; permitiendo de esta manera, determinar si el bioproducto evaluado podría ser emplearse dentro planes de manejo integrado de plagas.

## 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. El cultivo de rosa en el Ecuador

Ecuador es un país que posee una economía dependiente del desarrollo de actividades agrícolas, donde uno de los productos de exportación más importantes para el país son las flores. El área cosechada de flores en Ecuador en 2017 fue de 9612 ha, llegando así a una tasa de incremento equivalente a 20,06% en comparación al 2016. Las rosas conforman la mayor parte de las flores plantadas y cosechadas; con alrededor de 5650 ha cultivadas y el 55,01% de la superficie de flores cosechadas. A su vez, estas flores representaron el 4,53% de las importaciones llevadas a cabo en la Unión Europea en 2016 y abarcaron el 77% de las flores exportadas en el primer trimestre de 2017 (INEC, 2017).

El cultivo de la rosa es especialmente vulnerable a ciertos tipos de plagas, entre las que se incluye *Tetranychus urticae*. En 2012 esta plaga mostró una incidencia drástica, lo que implicó que las flores afectadas por esta plaga fueran rechazadas por parte del país importador Estados Unidos; el cual advirtió la aplicación de sanciones como el impedimento del ingreso de las rosas ecuatorianas al territorio. Las sanciones fueron evitadas tras el viaje de una delegación ecuatoriana y la aplicación de medidas de contingencia por parte de Agrocalidad. A raíz de estos inconvenientes causados por la incidencia de ácaro rojo en rosas, se planteó la Resolución 0176 donde se establece la normativa y el protocolo para el control obligatorio de ácaros en lugares y sitios de producción de rosa de exportación (Agrocalidad, 2012).

## 2.2. Generalidades de *Tetranychus urticae*

*Tetranychus urticae* o ácaro rojo es un artrópodo fitófago capaz de infestar 800 especies distintas de plantas, entre las que se incluyen frutas, maíz, algodón, vegetales y diversas ornamentales (Van Leeuwen, Vontas, Tsagkarakou, Dermauw, & Tirry, 2010). Estos ácaros habitan en ambientes templados y subtropicales, aunque pueden adaptarse a climas fríos. Su desarrollo embrionario se completa desde las 39 horas aproximadamente, y a partir de ese momento atraviesa por un ciclo de vida que incluye 4 estadios. *T. urticae* surge como larva de 6 patas a partir de un huevo transparente de 150  $\mu\text{m}$  y luego atraviesa dos transformaciones o “mudas” hasta alcanzar la etapa de protoninfa, cuando el cuarto par de patas emerge (Grbic, 2007). Posteriormente, el ácaro pasa por otra muda para convertirse en una deutoninfa, al aumentar su tamaño y permitir la distinción entre sexos, ya que las hembras tienen una mayor talla y una forma redonda; mientras que los machos son más pequeños, su cuerpo es alargado con la parte trasera redondeada (Figura 1). Finalmente se convierte en adulto al alcanzar la madurez sexual. El tiempo que dura el ciclo de vida es variable de acuerdo a las condiciones de temperatura, luminosidad y humedad principalmente, pudiendo oscilar entre los 7 y 17 días (Kanika Tehri, 2014)



Figura 1. *Tetranychus urticae* en sus estadios de huevo, larva y adulto

Tomado de Surendra, 2011.

Las hembras de este ácaro son diploides, debido a que emergen por huevos fertilizados, mientras que los machos son haploides, ya que por el contrario estos surgen de huevos no fertilizados, por partenogénesis arrenotoca de las hembras de esta especie. En su forma adulta, el ácaro posee cuatro pares de patas, manchas negras simétricas bilaterales en el opistosoma y presentan tres cromosomas de 75 Mpb (Grbic, 2007).

Por lo general los ácaros yacen en el envés de las hojas, aunque en infestaciones avanzadas se pueden mantener en el haz. Los ácaros rojos poseen quelíceros modificados llamados estiletos con los que perforan las células del envés vaciando su contenido; esto hace que el mesófilo colapse y presente clorosis en los sectores afectados. A medida que la infestación por parte del ácaro avanza, la tasa de fotosíntesis decae y el contenido de clorofila disminuye, lo que se traduce en síntomas como la defoliación, marchitez, desecación, deformación de hojas y en casos de infestación severa la muerte de la planta (Kanika Tehri, 2014). La infestación por ácaros produce reducciones significativas en el rendimiento y productividad de los cultivos y, además, los huevos, telarañas, heces y piel muerta producidos en el proceso ocasionan reducción en términos de calidad estética en ornamentales, como se aprecia en la Figura 2 (Capinera, 2008).



Figura 2. Hojas de rosa presentando síntomas de desecación y clorosis por la presencia de *Tetranychus urticae*

Tomado de Casey, 2007

### 2.3. Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria aerobia, no-encapsulada y gram-positiva que presenta una forma tubular y mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y alrededor de 1 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho. Posee flagelos peritricos que le permiten moverse y cumplen una función de virulencia al permitir la adhesión de la bacteria a la superficie de las células del insecto hospedero. Esta bacteria se caracteriza por la formación de cuerpos paraesporales que contienen proteínas de cristal (Cry) metabolitos y toxinas con actividad insecticida y esporas elipsoidales que tienen una forma cilíndrica y se ubican en el área central de la célula. La mayoría de variedades de *Bacillus thuringiensis* pueden hidrolizar caseína, gelatina y polímeros como el almidón; de igual manera, muchas cepas por lo general son oxidasa negativas, catalasa y citrato positivas (Rabinovitch, 2017).

Cuando existen nutrientes suficientes y accesibles en condiciones favorables para el desarrollo, la espora de la bacteria es capaz de germinar y de dar lugar a una célula vegetativa, la cual atravesará por dos procesos primordiales para el ciclo de vida: división celular vegetativa y síntesis de esporas (Ibrahim, Griko, Junker, & Bulla, 2010). Las diferentes variedades de *B. thuringiensis* son clasificadas a partir de ensayos de serotipificación mediante el uso de antígenos flagelares H. Sin embargo, cabe mencionar que la especificidad del microorganismo por el hospedero no está correlacionada con la subespecie a la que pertenece, pues esta especificidad está ligada directamente con el tipo de proteínas Cry que sintetiza la bacteria (Rabinovitch, 2017).

### **2.3.1. División celular**

Durante su división celular, *Bacillus thuringiensis* presenta la formación de un septo de división a lo largo de la membrana plasmática. Dicha estructura mide 12 nm de grosor y se define como una extensión de la pared celular y la membrana. Además, puede ser continuo, o hallarse asociado a vesículas membranales denominadas mesosomas, las cuales se presentan aleatoriamente en la periferia de la membrana plasmática. El mecanismo de división celular es simétrico e implica la obtención de dos células hijas idénticas (Bechtel & Bulla, 1982).

### **2.3.2. Esporulación**

La formación de esporas ocurre cuando existe un decrecimiento de nutrientes, fuente de carbono, oxígeno o en el caso de que las condiciones ambientales ya no sean óptimas. La esporulación, a diferencia de la división celular es asimétrica y se lleva a cabo en 7 etapas: I. formación de los filamentos axiales; II. formación del septo de la espora prematura; III. primera aparición de cristales paraesporales y formación de la espora prematura; IV a VI. formación de la exoespora, pared celular primordial y transformación del nucleóide de la



espora; y finalmente, VII. lisis celular y maduración de esporas, como se aprecia en la Figura 3 (Ibrahim, 2010).

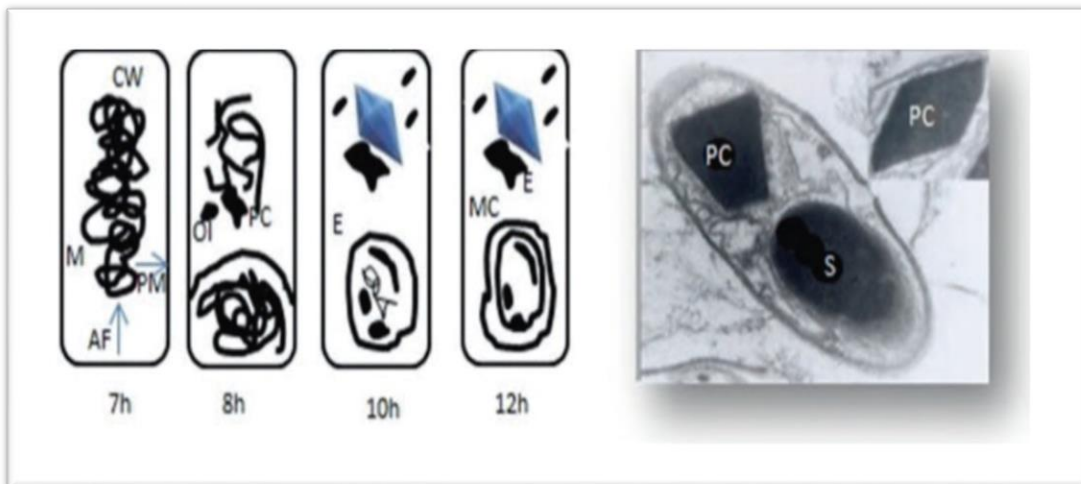


Figura 3. Esquema de las fases de esporulación de *B. thuringiensis*.

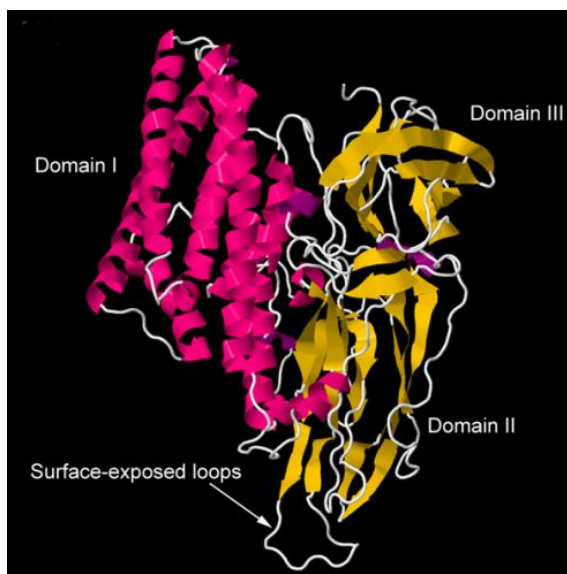
Tomado de Rabinovitch, 2017

a) M. mesosoma, CW. pared celular, PM. membrana plasmática, AF. filamento axial, OI. Inclusión ovoide y E. exospora. PC. cristal paraesporal, S. espora.

### 2.3.3. Estructura y mecanismo de acción de las proteínas Cry

Las proteínas Cry son producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis* durante la fase II de la esporulación y a partir de su síntesis, se almacenan en forma de cristales en la célula, los cuales pueden llegar a constituir el 25% del peso seco de las bacterias esporuladas (Rabinovitch, 2017). Las toxinas Cry corresponden a un conjunto de proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas y se dividen en varias familias: Proteínas Cry de tres dominios (3d-Cry), Proteínas Cry de tipo *mosquitocidal* (*Mtx-like* Cry), toxinas binarias tipo díptero-específicas (Bin-like Cry), y proteínas Cry que no se asocian con los grupos antes mencionados (Bravo, 2015). Las 3d-Cry se caracterizan por conformar la familia de toxinas más numerosa que permite el control de lepidópteros, dípteros, coleópteros y nematodos (Jouzani, Valijanian, & Sharafi, 2017). Todas

las 3d-Cry poseen tres dominios estructurales que guardan elevada semejanza topológica. El dominio I se conforma de un ramillete de 7  $\alpha$ -hélices conectadas entre sí por bucles, donde la quinta  $\alpha$ -hélice posee una naturaleza hidrofóbica y se encuentra en el centro del ramillete; el dominio II consta de tres láminas  $\beta$  antiparalelas empaquetadas en torno a núcleo hidrofóbico, dando paso a la formación del prisma  $\beta$  cuyos extremos terminales de igual forma se unen por bucles; y el dominio III se compone por dos láminas  $\beta$  antiparalelas dispuestas a manera de un sánduche  $\beta$ , como se muestra en la Figura 4 (Ibrahim, 2010). Estas toxinas han sido ampliamente estudiadas y poseen dos modelos propuestos con respecto a su mecanismo de acción, el de lisis osmótica por formación de poro y muerte celular por cascada de señales dependiente adenilil ciclasa.



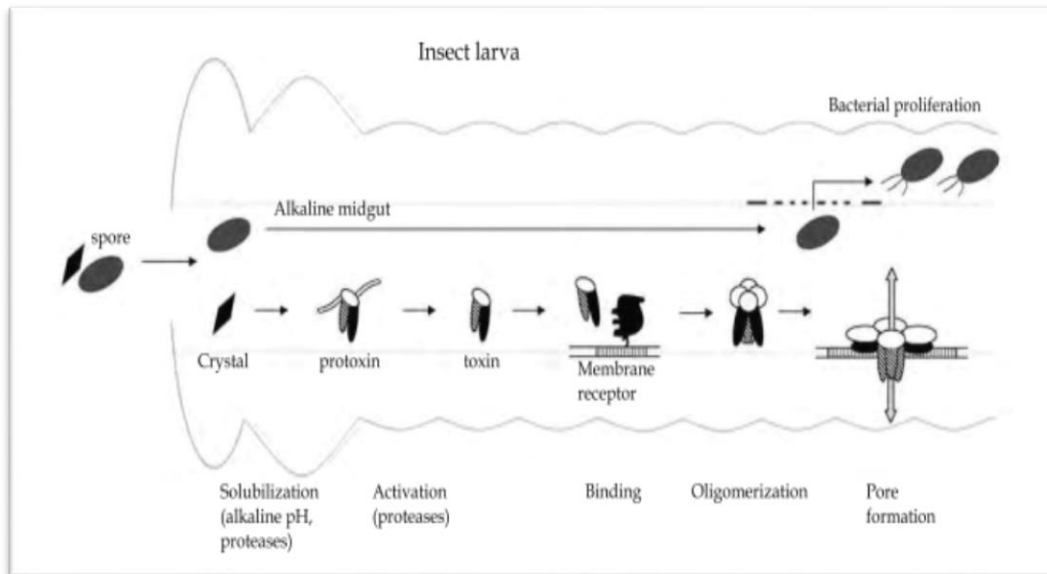
*Figura 4.* Representación de la estructura tridimensional de la proteína Cry 1Aa.

Tomado de Jurat-Fuentes & Jackson, 2012

a) Las hélices  $\alpha$  se encuentran en color rosado. Las láminas plegadas  $\beta$  se encuentran en color amarillo, y los bucles entre dominios de color blanco.

El primer modelo propuesto con respecto al mecanismo de acción es el de formación de poro, donde se establece que las 3d-Cry se empaquetan como

protoxinas de longitud corta y larga en los cuerpos de inclusión, las cuales pesan de 70 y 130 kDa, respectivamente. Al ser ingeridos por los insectos, los cuerpos de inclusión se disuelven en el intestino gracias al pH alcalino, donde las proteasas presentes activan ambas protoxinas al escindir una región pequeña del extremo N-terminal y adicionalmente, en el caso de las protoxinas de longitud larga, un fragmento del extremo C-terminal, dejando protoxinas activadas de alrededor de 60 kDa conformadas por 3 dominios. Una vez que las protoxinas se encuentran activadas, se hipotetiza que estas son capaces de interactuar con un receptor de fosfatasa alcalina (RFA) y un receptor de aminopeptidasa N (RAN); donde ambos están fusionados a la membrana mediante una molécula de anclaje de glicosil fosfatidilinositol (GFI). El dominio III se empalma con el RFA, mientras que el tercer bucle del dominio II se une con RAN. La asociación de la protoxina activada a estos receptores acerca a la misma a un receptor de cadherina en la membrana, permitiendo que la hélice  $\alpha$ -8, el segundo y el tercer bucle del dominio II se puedan unir a la cadherina. La interacción entre cadherina y protoxina provoca un cambio conformacional en la última que posibilita la oligomerización por el corte de extremo N-terminal de la hélice  $\alpha$ -1. Finalmente, la forma oligomerizada de la toxina se junta con otros receptores de membranas para introducir la hélice hidrofóbica  $\alpha$ -5 en la membrana del intestino, lo que conlleva a la formación de los poros y un consecuente shock osmótico, como se observa en el esquema de la Figura 5 (Bravo, 2015).



*Figura 5.* Modelo de formación de poro por las proteínas Cry en el epitelio del insecto

Tomado de Després, 2011.

Por otro lado, el segundo modelo establece la presencia de una trasducción de señales mediante la unión de las 3d-Cry al receptor de cadherina BT-R<sub>1</sub>, el cual se trasloca desde el interior de la célula hacia la membrana por medio de vesículas. Esto permite la activación de una ruta de señalización celular dependiente de ion magnesio (Mg<sup>2+</sup>) que empieza por la estimulación de la proteína G que promueve la activación de una adenil ciclasa (AC) que induce un aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP) que activa a la proteína quinasa A (PKA), lo que conduce a modificaciones en el citoesqueleto y movimiento de iones y que en última instancia resulta en muerte celular programada como se aprecia en la Figura 6 (Zhang, Candas, Griko, Taussig, & Bulla, 2006).

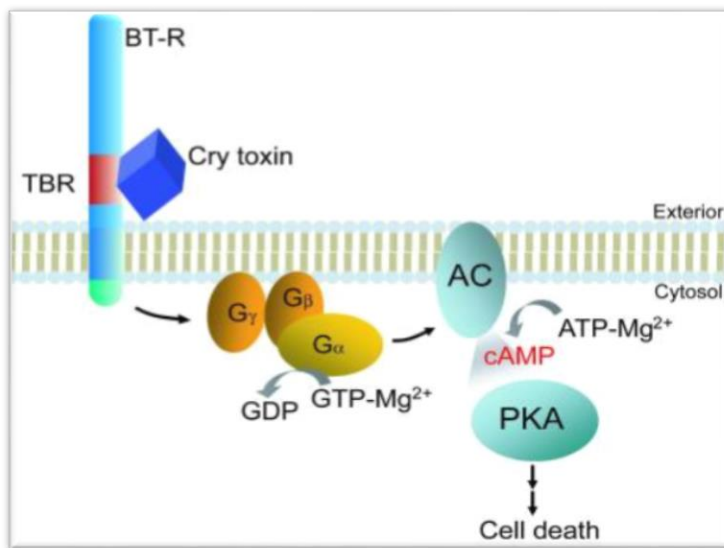


Figura 6. Modelo de muerte celular por cascada de señales dependiente adenilil ciclasa por proteínas Cry.

Tomado de Zhang, 2006.

#### 2.3.4. Otras toxinas de *Bacillus thuringiensis*

La bacteria *B. thuringiensis* cuenta con otras toxinas y proteínas que poseen actividad insecticida o que colaboran con esta. Entre ellas se encuentran: las toxinas citolíticas (Cyt), proteínas insecticidas vegetativas (Vip) y proteínas insecticidas secretadas (Sip). Las toxinas Cyt son proteínas que como las proteínas Cry, se sintetizan en cuerpos paraesporales en cristales. Estas proteínas poseen un solo dominio  $\alpha$ - $\beta$  compuesto por dos  $\alpha$ -hélices que rodean a una lámina  $\beta$ . Se ha observado que estas toxinas pueden provocar la muerte de los insectos mediante la unión no específica con lípidos no glicosilados de la sección microvellosa de la membrana intestinal del insecto, además las proteínas Cyt se agregan y producen fallas en la membrana y en el equilibrio osmótico, lo que conduce a lisis celular (Palma, Muñoz, Berry, Murillo, & Caballero, 2014). Por otro lado, además de promover la lisis osmótica, entre las funciones de estas toxinas se encuentran su capacidad hemolítica, la habilidad de ocasionar un impacto sinérgico en su actividad insecticida junto a determinadas proteínas Cry y al mismo tiempo disminuir la resistencia de

ciertas especies de insectos a toxinas Cry determinadas (George & Crickmore, 2012).

Las toxinas Vip son un grupo de proteínas que no forman cristales, y son capaces de influir en la polimerización de la actina-G, interfiriendo con la integridad del citoesqueleto de las células del epitelio intestinal de lepidópteros y coleópteros. Estas toxinas se dividen en Vip1, Vip2 y Vip3; y pueden formar canales iónicos en la membrana induciendo a la vacuolización del citoplasma que posteriormente conlleva a la muerte celular (Chakroun, Banyuls, Bel, Escriche, & Ferré, 2016).

Por otro lado, las proteínas Sip constituyen toxinas de las que aún no se ha dilucidado su mecanismo de acción, sin embargo se ha evidenciado de su efectiva capacidad insecticida en larvas de coleópteros (Palma, Muñoz, Berry, Murillo, & Caballero, 2014)

Adicionalmente a las toxinas indicadas anteriormente, Bt posee otros componentes que cooperan en la acción entomopatógena, tales como:  $\beta$ -exotoxina, proteasas, quitinasas, y fosfolipasas. La  $\beta$ -exotoxina se produce durante la fase exponencial de crecimiento de la bacteria y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de ARN a través de la competición de este compuesto por los sitios de unión con el ATP. Los efectos de la  $\beta$ -exotoxina se pueden apreciar especialmente durante las etapas de quiescencia y pupación en dípteros (Sansinenea, 2012).

### **3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS**

#### **3.1. Material de experimentación**

Se partió de una población de ácaros correspondientes a la especie *Tetranychus urticae* que fueron recolectados en una finca florícola ubicada en

el cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha (0° 22' 43.45" S; 78° 24' 44.3"). Los ácaros recolectados se emplearon para la infestación de rosas en un invernadero controlado, con el fin de obtener un pie de cría. Se realizó un monitoreo del pie de cría periódico para revisar su estado y reemplazar las plantas cuyo nivel de infestación denotaba un deterioro grave.

### **3.2. Determinación de concentración y pureza del bioproducto**

Paralelamente, la determinación de la concentración y pureza del bioproducto se ejecutó de acuerdo con los protocolos provistos por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) con modificaciones. En principio, se disolvieron 10 g de bioproducto en 90 mL de diluyente estéril. Seguido a esto, el bioproducto se mantuvo en agitación constante durante 30 min. Posteriormente, se transfirió 1 ml de la suspensión a un tubo de ensayo con 9 ml de diluyente, para continuar con una dilución seriada hasta  $10^{-5}$ . Una vez hecho esto, las diluciones desde  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  fueron inoculadas individualmente en cajas Petri con agar nutriente sólido y en cajas de medio PDA con  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de cloranfenicol. Después, se llevó a cabo el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en las placas de agar nutriente y PDA transcurridas las 24, 48 y 72 horas. Durante el tiempo transcurrido simultáneamente se registró el crecimiento de contaminantes como hongos y levaduras en las placas. Este procedimiento fue llevado a cabo dos veces. El rango de conteo para las UFC de las bacterias que conforman el principio activo del bioproducto es de 30 a 300; mientras que, para levaduras y hongos contaminantes el rango es de 10 a 100 UFC. La pureza del bioproducto se definió mediante el cálculo del porcentaje de pureza con la fórmula (1):

$$(1) \% \text{ Pureza} = \left( \frac{A}{A + B + C} \right) \times 100$$

Donde:

$$A = \text{N}^\circ \text{UFC de biocontrolador} \times \frac{1}{\text{Dilución}} \times 10$$

*A: equivale al número de UFC del microorganismo biocontrolador por ml de producto que se encuentran en el cultivo de agar nutriente de la dilución que esté dentro del rango de conteo establecido.*

*B: equivale al número de UFC de levaduras contaminantes por ml de producto que se encuentran en el cultivo de PDA con antibiótico de la dilución que esté dentro del rango de conteo.*

*C: equivale al número de UFC de hongos contaminantes por ml de producto que se encuentran en el cultivo de PDA con antibiótico de la dilución que esté dentro del rango de conteo.*

*Posteriormente, se realizó tinción gram como lo indica el protocolo de (Smith & Hussey, 2005); y tinción de esporas con verde de malaquita de la bacteria cultivada en las cajas Petri de agar nutriente.*

### **3.3. Tratamientos y variables de estudio**

Con el bioproducto analizado y caracterizado se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con los siguientes elementos: 27 unidades experimentales, formadas por la aplicación de 9 tratamientos (3 tratamientos por cada estadio de desarrollo) con 3 repeticiones cada uno y un blanco o control por cada tratamiento. El control consistió en una unidad experimental por repetición de cada tratamiento a la cual se le aplicó una aspersion de agua estéril. Las fases de desarrollo del ácaro (F), fueron estudiadas en diseños separados, siendo estas: larva (F<sub>1</sub>), protoninfa (F<sub>2</sub>) y adulto (F<sub>3</sub>). Los tratamientos y controles antes mencionados se replicaron tres veces en el tiempo. Para formar dichos tratamientos, se consideró como factor a la



concentración del bioproducto (C), para el cual se evaluaron tres dosis: 5 g L<sup>-1</sup> (C<sub>1</sub>), 10 g L<sup>-1</sup> (C<sub>2</sub>) y 20 g L<sup>-1</sup> (C<sub>3</sub>).

Las variables de respuesta del estudio se definieron de la siguiente forma: Mortalidad (M), porcentaje de eclosión (E), porcentaje de inhibición de eclosión (IE) y el índice de actividad de ovoposición (IAO). La distribución de las variables de respuesta para los tratamientos se aprecian en las Tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1.

*Distribución de tratamientos y variables de respuesta para el estadio de larvas*

Estadío	Concentración	Tratamiento	Variables de respuesta
F <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	T1	E, IE, M
	C <sub>2</sub>	T2	
	C <sub>3</sub>	T3	

Tabla 2.

*Distribución de tratamientos y variables de respuesta para el estadio de protoninfas*

Estadío	Concentración	Tratamiento	Variables de respuesta
F <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	T4	M
	C <sub>2</sub>	T5	
	C <sub>3</sub>	T6	

Tabla 3.

*Distribución de tratamientos y variables de respuesta para el estadio adulto*

Estadio	Concentración	Tratamiento	Variables de respuesta
F <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	T7	M, IAO
	C <sub>2</sub>	T8	
	C <sub>3</sub>	T9	

Durante los bioensayos, IE y E fueron las variables examinadas para la demostración del efecto ovicida del bioproducto; M fue la variable de respuesta analizada para la verificación de los efectos larvicida, ninficida y adulticida de *B.thuringiensis*; y el IAO, fue la variable medida para la comprobación de la presencia de efectos subletales en la ovoposición de *T.urticae*.

### 3.3.1 Efecto ovicida y larvicida de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*

Para evaluar el efecto ovicida y larvicida del bioproducto, se siguió la metodología establecida por Kumari, Chauhan, Kumari, & Nadda, 2017; la cual consistió en la transferencia de 10 ácaros adultos al envés de una hoja de rosa previamente esterilizada que yacía sobre una cama de algodón empapado de agua estéril en una caja Petri con ventilación. Después de 24 horas, los ácaros fueron retirados y el número de huevos presentes en la hoja fue ajustado a 20. Una vez hecho esto, se realizó una aspersion del bioproducto en los tratamientos T1, T2 y T3. Inmediatamente, las cajas se incubaron a 26°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad. Se llevó un registro diario durante 12 días del número de especímenes midiendo las variables de respuesta E, IE y M.

El E se calculó mediante la fórmula (2) (Haque, 2014):

$$(2) E = \left( \frac{L}{H} \right) \times 100$$

*L: número de larvas eclosionadas del tratamiento.*

*H: número de huevos incubados.*

El IE se calculó a través de la fórmula (3) (Haque, 2014):

$$(3) IE = \left( \frac{Ec - Et}{Ec} \right) \times 100$$

*Ec: porcentaje de eclosión del control.*

*Et: porcentaje de eclosión del tratamiento.*

La mortalidad corregida fue calculada tras 12 días de ejecución de los bioensayos para larvas con la fórmula (4) (Abbott, 1925):

$$(4) M = \left( \frac{\%Mt - \%Mc}{100 - \%Mc} \right) \times 100$$

*Mt: mortalidad del tratamiento.*

*Mc: mortalidad del control.*

### 3.3.2. Efecto ninficida de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*

Para evaluar el efecto ninficida del bioproducto, se siguió la metodología establecida por Kumari (2017) con modificaciones. Se realizó la transferencia

de 16 protoninfas, provenientes de una población de la misma edad al envés de una hoja de rosa previamente esterilizada que yacía sobre una cama de algodón empapado de agua estéril en una caja Petri con ventilación a la cual previamente se le había hecho una aspersión del bioproducto en los tratamientos T2, T5 y T8. Inmediatamente, las cajas se incubaron a 26°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad. La variable M fue calculada tras 7 días del bioensayo con la fórmula (4).

### **3.3.3. Efecto de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* en adultos y su ovoposición**

Para evaluar el efecto del bioproducto en la ovoposición del ácaro rojo se siguió el protocolo establecido por Marcic, 2007; para lo cual un total de 50 hembras y 20 machos de *Tetranychus urticae* fueron colocados sobre el envés de hojas de rosa. Al mismo tiempo, las hojas fueron ubicadas con el haz hacia abajo en una cama de algodón empapado con agua estéril en cajas Petri de plástico. Se dejó a las hembras poner huevos durante 24 h a 26°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Una vez obtenidos los huevos, las hembras y los machos fueron retirados. El desarrollo de los huevos fue monitoreado durante los siguientes días en las mismas condiciones, hasta que alcanzaron el estadio adulto y se obtuvo de esta manera, una población de la misma edad. Posteriormente, las hembras fecundadas fueron trasladadas a una nueva caja Petri, donde se colocó una hembra de manera individual sobre un disco de hoja de rosa. A los discos de hoja de cada unidad experimental se les roció el bioproducto a base de *Bacillus thuringiensis* a las concentraciones establecidas para los tratamientos T7, T8 y T9. Se colocaron 10 discos de hoja en cada caja; los huevos fueron contados y retirados diariamente hasta la muerte del ácaro. Las variables de respuesta fueron M a los e IAO a los cinco días de exposición al biocontrolador. El IAO fue medido como se indica en la fórmula (5):

$$(5) \text{ IAO} = \left( \frac{H_t - H_c}{H_t + H_c} \right)$$

*Ht: cantidad de huevos del tratamiento.*

*Hc: número de huevos presentes en el control*

El IAO tiene un rango que va desde -1 a +1. La obtención de un índice con números positivos implica que una mayor cantidad de huevos fueron puestos en los tratamientos; mientras que por el contrario, un número negativo de 0 implica que la puesta de huevos fue superior en el control; y por último, si el 0 es equivalente a 0, este corresponde a una respuesta neutra (Soonwera & Phasomkusolsil, 2017).

### **3.4. Extracción de ADN, electroforesis y PCR de genes Cry**

Se llevó a cabo la extracción de ADN de la bacteria empleando el kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher. Estados Unidos). La muestra de ADN fue corrida en un gel de electroforesis de agarosa al 1% con TBE por 30 min a 120 V para verificar la calidad del ADN extraído.

Para la determinación del potencial entomopatógeno de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* se llevó a cabo la PCR de los genes Cry de este microorganismo, para lo cual se utilizaron los primers, condiciones de PCR y volúmenes especificados en las Tablas 4, 5 y 6 mostradas a continuación.

Tabla 4.

*Primers y secuencias para identificación de genes Cry*

Gen	Secuencia de primer	
	Forward	Reverse
Cry 1	MDATYTCTAKRTCTTGACTA	TRACRHTDDBDGTATTAGAT
Cry 2	GTTATTCTTAATGCAGATGAAT GGG	CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT
Cry 3	CGTTATCGCAGAGAGATGACAT TAAC	CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT
Cry 4	GCATATGATGTAGCGAAACAAG CC	GCGTGACATACCCATTTCAGGTCC

Tabla 5.

*Condiciones de PCR para los genes Cry*

Gen	Condiciones de PCR
Cry 1 (1500bp)	Desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización por 1 min; <i>annealing</i> a 47°C por 1 min; extensión a 70°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min (Lone, Malik, & Padaria, 2017)
Cry 2 (700bp)	Desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, posteriormente 30 ciclos de desnaturalización por 1 min; <i>annealing</i> a 59°C por 1 min; extensión a 70°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min (Lone, Malik, & Padaria, 2017).
Cry 3 & Cry 4  (589- 604bp) & (439bp)	Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s; <i>annealing</i> de 55°C (Cry 3) / 60°C (Cry 4) durante 50 s; posteriormente una extensión a 72°C por 75 s y una extensión final de 7 min a 72°C (Salama, Abd El-Ghany, & Saker, 2015).

Tabla 6.

*Volúmenes y concentraciones para las reacciones de PCR*

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final ( $\mu\text{L}$ ) para reacción de 50 $\mu\text{L}$
Agua grado PCR	-	-	28,4
PCR Buffer	10X	1X	5
MgCl <sub>2</sub>	50 Mm	3 mM	3
dNTPs	10 Mm	0,2 mM	1
Primer F	5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	5
Primer R	5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	5
Platinum Taq® polimerasa	240 U	2 U/rx	0,2
ADN	-	-	3

Posteriormente, se corrieron los amplicones en un gel de electroforesis al 1% con buffer TBE a 110 V por 30 min. Después, estos fueron secuenciados por Macrogen© y las secuencias obtenidas se analizaron en el software Geneious® y posteriormente en BLAST del NCBI.

### 3.5. Evaluación estadística de los resultados

La evaluación estadística de los resultados se realizó a través del análisis de varianza (ANOVA) de un factor para todas las variables de respuesta a excepción del IAO. En los tratamientos en los que se detectaron diferencias significativas se aplicó la prueba Tukey. Por otro lado, la variable de IAO se analizó a través de pruebas de t. El nivel de significancia fue de 0,05 en todas las pruebas aplicadas, para lo que se empleó la versión 24 del software estadístico SPSS® de IBM.

### 3.6. Diagrama de flujo del desarrollo del estudio

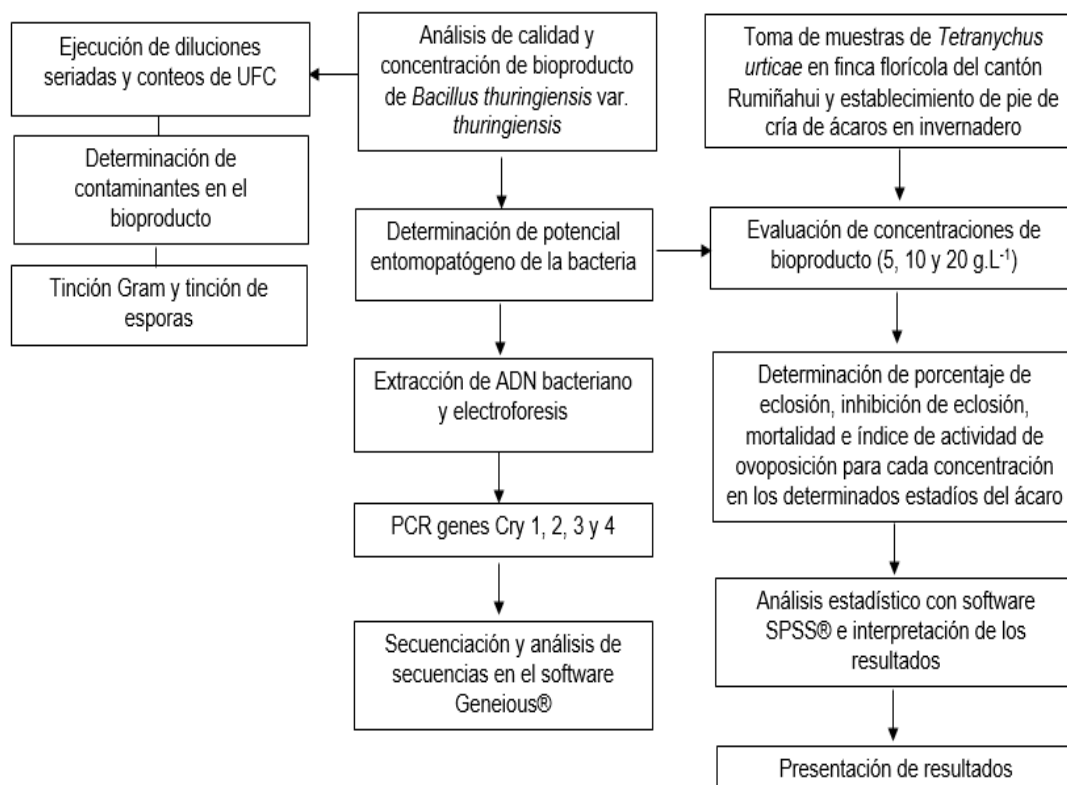


Figura 7. Esquema de actividades para desarrollo del proyecto

## 4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Determinación de pureza y concentración

El porcentaje de pureza obtenido para el bioproducto fue del 99% y una concentración de  $1,03 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>. De acuerdo a la normativa del ICA, el porcentaje de pureza debe ser igual o superior al 95% y la concentración igual o superior a  $10^8$ ; por lo tanto, el bioproducto a base de *Bacillus thuringiensis* cumple con los parámetros establecidos, presentando una mínima contaminación y elevada concentración del principio activo.

Por otro lado, se comprobó el estado del bioproducto mediante tinción gram y tinción de esporas, verificándose así, que la bacteria tiene forma tubular y es



gram positiva como se observa en la Figura 8(A); además, de observarse la presencia de endoesporas en la misma, como también se muestra en la Figura 8 (B).

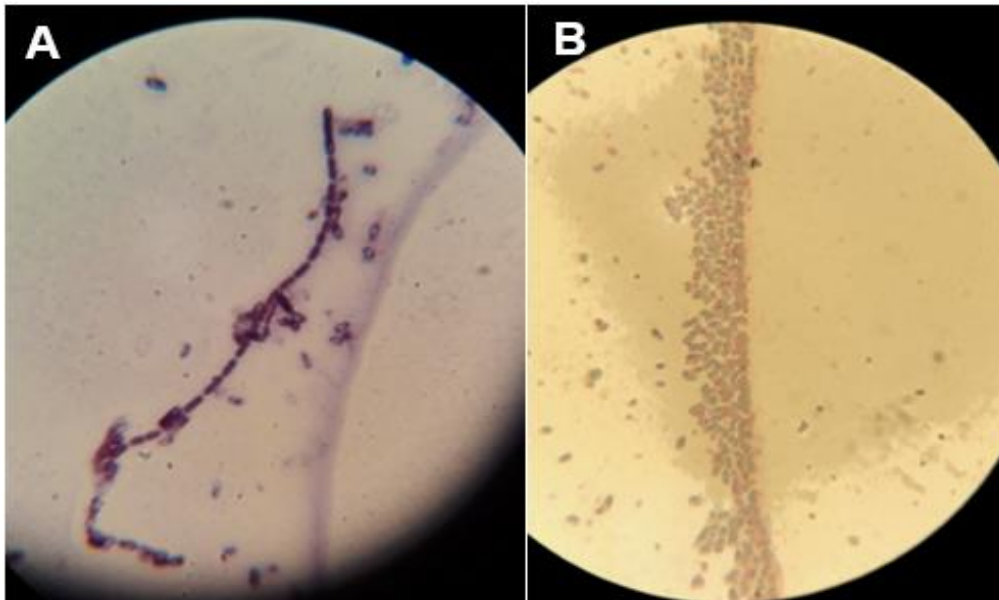


Figura 8. Análisis de pureza del bioproducto a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*.

- a) Tinción gram
- b) Tinción de esporas de la bacteria con verde de malaquita.

#### 4.2. Efecto de *B.thuringiensis* var. *thuringiensis* en eclosión e inhibición de eclosión

El ANOVA demostró que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el blanco; obteniéndose porcentajes de eclosión promedio de 72,22, 77,77, 77,22 y 86,67% para T1, T2, T3 y el control respectivamente. Esto se visualiza en la Figura 9. Así mismo, tampoco se hallaron diferencias significativas para la inhibición de eclosión; ya que, se obtuvieron porcentajes promedio de 16,15, 9,0 y 8,93% para los tratamientos T1, T2 y T3.

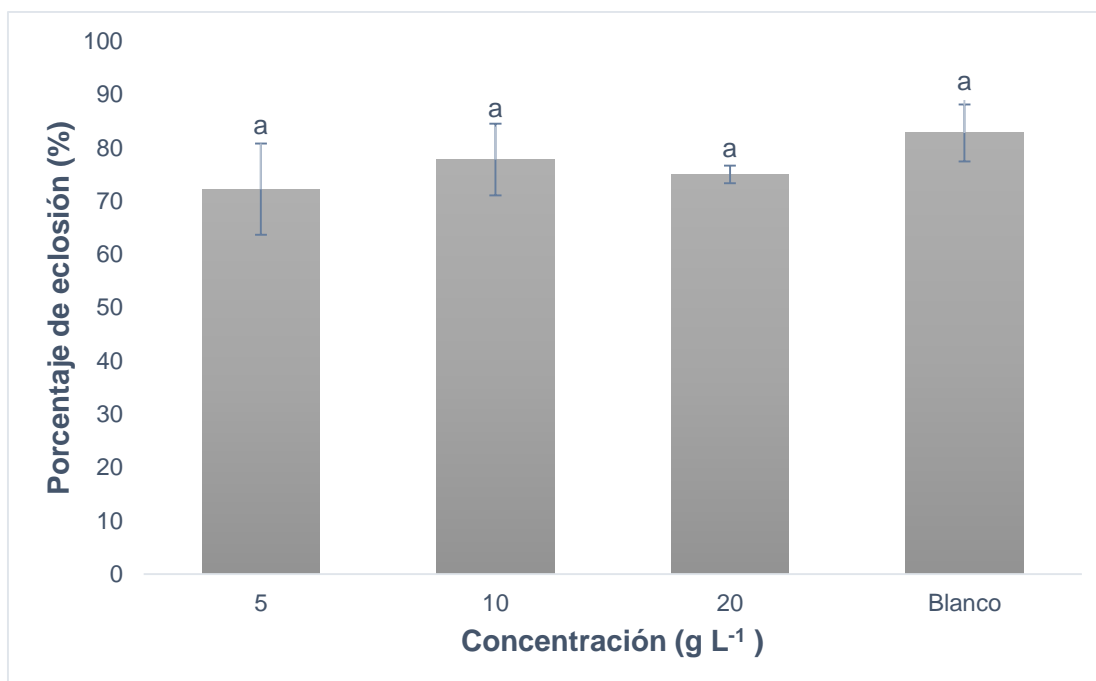


Figura 9. Porcentaje de eclosión de *T. urticae* con respecto a las concentraciones del biocontrolador a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* con significancia de  $P < 0,05$

Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Chapman & Hoy (1991); donde la aplicación de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* mediante aspersion a huevos de *Tetranychus urticae* y *Metaseiulus occidentalis* no afectó al porcentaje de eclosión de los huevos de ninguno de estos especímenes, ya que esta variable se mantuvo en 97,2 y 98% para cada especie, respectivamente. De igual manera, se ha demostrado que la aplicación de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* no tuvo impacto en términos de susceptibilidad en huevos de *Tetranychus cinnabarinus*, infiriendo que los otros estadios de desarrollo del artrópodo eran menos tolerantes al tratamiento con este microorganismo (Zhu, Sengonca, & Liu, 2005). Por otro lado, varias proteínas Cry tampoco han mostrado no poseer un efecto sinérgico o individual en la eclosión de huevos del ácaro rojo. El estudio llevado a cabo por Shu, Romeis, & Meissle, 2018 reportó no haber encontrado alteraciones en la eclosión de huevos depositados por hembras de *T. urticae* que habían sido alimentadas con maíz transgénico que expresaba las proteínas: Cry1A.105, Cry 1F, Cry2Ab, Cry3Bb1, Cry34Ab1 y Cry35Ab1. Se observó que únicamente el 3,6 y 2,3% de

los huevos no eclosionaron en los tratamientos con maíz transgénico y el maíz control, respectivamente. Adicionalmente, se ha verificado que la exposición directa de los huevos del ácaro rojo a la toxina proveniente de *B. thuringiensis*, *thuringiensis*; también careció de consecuencias en los porcentajes de eclosión (Vargas, Chapman, & Penman, 2001). Debido a esto, se puede decir que *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* no tiene una capacidad ovicida con respecto a *T. urticae*, y que, al contrario, los huevos de este artrópodo muestran cierta capacidad de tolerancia ante la acción de este biocontrolador efecto observado en el presente estudio

#### **4.3. Capacidad larvicida y ninficida de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis***

Los ANOVAS en el caso de mortalidad en larvas y mortalidad de protoninfas, demostraron que existen diferencias significativas entre los tratamientos con *B. thuringiensis* y el control. Sin embargo, no se presentaron diferencias entre los tratamientos, como evidencian las Figuras 10 y 11. Se obtuvieron mortalidades promedio en larvas de 80,66, 85,87 y 97,53% correspondiente a T1, T2 y T3; mientras que para el control la mortalidad en larvas fue de 8,02%. Por otro lado, para el estadio de protoninfas, las mortalidades fueron de 68,54, 84,44, 85,89 y 23,61% para el T4, T5, T6 y control, respectivamente.

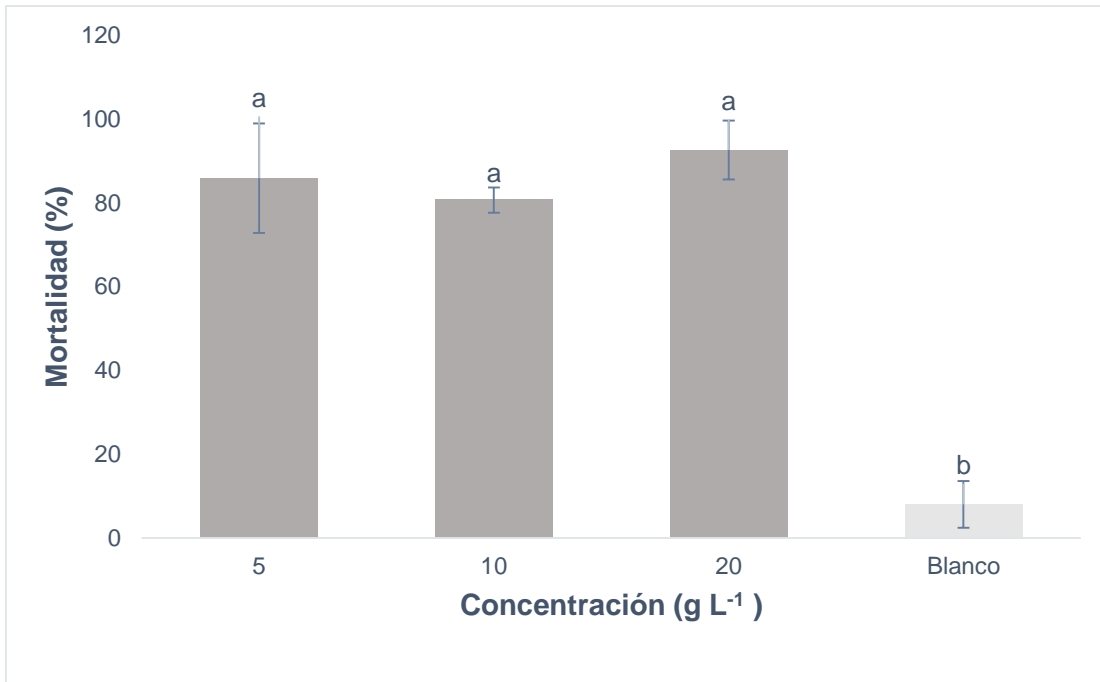


Figura 10. Mortalidad de larvas de *T. urticae* con respecto a las concentraciones del biocontrolador a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* con significancia de  $P < 0,05$

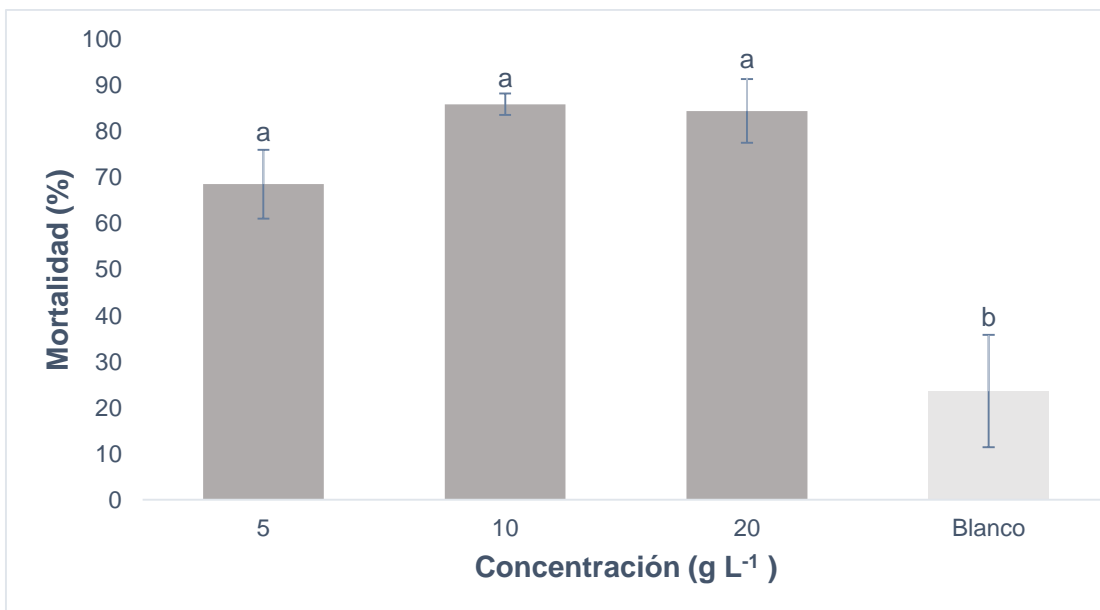


Figura 11. Mortalidad de protoninfas de *T. urticae* con respecto a las concentraciones del biocontrolador a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* con significancia de  $P < 0,05$

Señalan que las tres concentraciones son efectivas en la misma magnitud con respecto al control del ácaro en sus estadíos tempranos. Los resultados obtenidos se corresponden a lo observado en el estudio de Zhu (2005), donde se indica que los estadíos más vulnerables a la acción del biocida formulado a base de las toxinas de *B. thuringiensis* con abamectina (GCSC-BtA), son los juveniles en bioensayos con *Tetranychus cinnabarinus*. La capacidad larvicida y ninficida de *B. thuringiensis* y sus biomoléculas se ha verificado en algunos estudios, como en el de Vargas (2001), donde se encontró que los estadíos de larva y protoninfa de *T.urticae* eran especialmente susceptibles al efecto de la *thuringiensin* en comparación a los estadíos de deutoninfa y adulto; presentando una mortalidad de 99,5% en larvas a la concentración de 0,03 g L<sup>-1</sup> y una mortalidad de 32,4% en protoninfas a la concentración de 0,003 g L<sup>-1</sup> (Vargas, 2001).

Adicionalmente, en el estudio hecho por Royalty (1990) se identificó el mayor impacto en la mortalidad en los estadíos tempranos después de los 12 días de exposición a *thuringiensin*, efecto que se relaciona a lo obtenido en el presente estudio con los ensayos con *B.thuringiensis* var. *thuringiensis*, donde de igual manera, la mayor influencia en la mortalidad larvaria fue registrada transcurridos los 12 días. Adicionalmente, el efecto de la *thuringiensin* evaluado por Hoy & Ouyang (1987), en el desarrollo de las etapas tempranas del ácaro *T. pacificus* demostró que esta toxina producida por *B. thuringiensis* interfirió en el proceso de quiescencia del artrópodo, haciendo que pocas larvas pudieran atravesar el periodo de quiescencia, y a su vez, que ninguna de las larvas sobreviviera más allá de las 144 horas. Así mismo, se apreció en los resultados de dicho estudio que todos los huevos rociados con la toxina eclosionaron, pero que la supervivencia posterior de las larvas se vio comprometida, como ocurrió durante los bioensayos del presente estudio. A pesar de que el mecanismo de acción de la *thuringiensin* no ha sido completamente dilucidado, se conoce que al ser una molécula análoga al ATP, compite con este por los sitios de unión de la RNA polimerasa, actuando como inhibidor de los procesos de síntesis de ARN y en consecuencia, con la síntesis de proteínas (Dent,

1993). Los cambios en la síntesis de ARN impactan a las etapas tempranas de insectos y artrópodos de manera especialmente negativa, por tratarse de periodos donde esta función celular se encuentra más activa, al ocurrir en fases de desarrollo previas a alcanzar la etapa de adulto, donde se presenta una alta demanda de biomoléculas para sostener al metabolismo. Se ha comprobado que algunos de los indicios de intoxicación de insectos por elevadas dosis de *thuringiensin* incluyen pupación anormal, falta de respuesta durante quiescencia y eventualmente la muerte (Liu, 2014). Durante este estudio, se pudo apreciar que varias de las larvas y protoninfas de los bioensayos morían durante la etapa de quiescencia.

Debido a que todas las dosis ensayadas en el estudio poseen el mismo efecto en larvas y protoninfas, se debe considerar a la concentración de  $5 \text{ g L}^{-1}$  como la más adecuada para su aplicación; ya que, es la dosis más baja capaz de conservar la efectividad de su acción acaricida en la misma magnitud que las otras dosis. Aun así, es necesario señalar que no se han registrado los efectos que tienen *B. thuringiensis* y sus componentes en la herencia de resistencia para el ácaro rojo. Sin embargo, se ha evidenciado que durante la aplicación en bajas concentraciones de bioproductos que contienen proteínas Cry o *B. thuringiensis* en ciertas plagas como *P. xylostella*, la capacidad de resistencia se mantiene como un carácter dominante; mientras que, en altas dosis, este carácter se vuelve recesivo (Sayyed, Omar, & Wright, 2004). En vista de esto, la utilización de una concentración elevada se consideraría como la más efectiva únicamente bajo la circunstancia en que la capacidad de resistencia no sea enteramente dominante, porque de no ser así, se efectuaría un incremento en la frecuencia en los alelos de resistencia en la población expuesta (Siegwart, 2015). Debido a esto, la herencia del carácter de resistencia para *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* y sus derivados requiere de más estudios para determinar su comportamiento en las diversas poblaciones de *T. urticae* con respecto al tiempo, con el fin de establecer con mayor precisión la relación de las dosis de exposición con la dominancia de la resistencia en este espécimen.

#### 4.4. Detección de genes Cry en *Bacillus thuringiensis* y su relación con efecto acaricida en adultos

Los resultados de mortalidad en individuos adultos fueron sometidos a un ANOVA, el cual demostró que no existieron diferencias significativas, obteniéndose mortalidades promedio de 74,44, 53,33, 50,0 y 55,0% entre T7, T8, T9 y el control respectivamente, como se aprecia en la Figura 12.

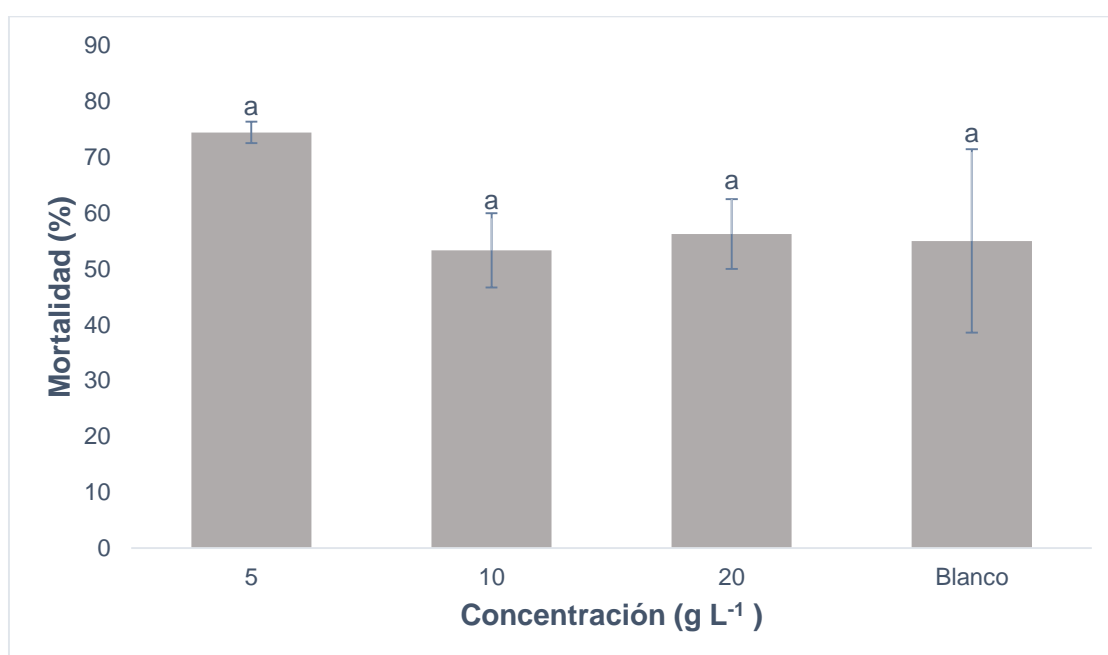


Figura 12. Mortalidad de adultos de *T. urticae* con respecto a las concentraciones del biocontrolador a base de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* con significancia de  $P < 0,05$

En varios estudios se han obtenido respuestas similares de parte de *T. urticae* en adultos ante tratamientos con otra variedad de *Bacillus thuringiensis* y ciertas proteínas. Por ejemplo, se ha reportado que la formulación en base a *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* de Abbott careció de efectos en términos de supervivencia para los adultos hembra del ácaro rojo en todas las concentraciones a las que se probó el biocontrolador, denotándose que ninguno de los tratamientos se diferenció de los controles (Chapman & Hoy, 1991). En la investigación de Shu (2018); se reveló que tras la exposición del

ácaro rojo a la planta transgénica de maíz Smart Stax® el fitófago no presentó diferencias significativas en las variables de mortalidad, fecundidad y desarrollo. Smart Stax® se caracteriza por expresar seis diferentes proteínas Cry: Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry3Bb1, Cry 1F, Cry1A.105 y Cry2Ab2. El estudio indicado demostró que no existe efecto de sinergia entre estas proteínas Cry, a parte de la nula influencia que tienen dichas toxinas sobre las variables antes mencionadas para el ácaro rojo. Así mismo, se ha reportado que la proteína Cry1Ab no mostró modificar la tasa natural intrínseca de crecimiento y mortalidad en *T. urticae* (A. Dutton, Klein, Romeis, & Bigler, 2002). A estas investigaciones, se suman otras como la de Guo (2016); donde se verificó de igual manera que las proteínas Cry1Ac/Cry2Ab y Cry1F no tienen ninguna incidencia en la supervivencia, fertilidad y tiempo de desarrollo del artrópodo.

A pesar que, en la mortalidad de adultos no se reportaron diferencias significativas, se pudo apreciar que el IAO sí evidenció alteraciones. Después de haber aplicado la primera prueba de t de Student para T7, T8 y T9 cuando el valor de prueba fue -1, se obtuvo un valor t de 8,49, demostrándose que los índices de actividad de ovoposición de los tratamientos fueron superiores a -1. Los índices promedio fueron de -0,46, -0,71 y -0,57 respectivamente para cada tratamiento. A su vez, en la segunda prueba de t de Student, se comprobó que los índices eran menores a 0, como se verificó al haber obtenido un valor t igual a -11,65. Ambas pruebas de t con un intervalo de confianza del 95%. Esto demuestra que en relación al control, los tratamientos poseen una disminución en la oviposición por parte de *T. urticae* al entrar en contacto con la bacteria, demostrando que a pesar que la bacteria no evidencia modificación en la mortalidad en el estadio adulto, provoca un efecto subletal en el mismo. Los resultados obtenidos en los bioensayos ejecutados coinciden como los referidos por Dutton, (2003); donde se encontró que al probar el biocontrolador Dipel® a base *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* contra *T. urticae* se presenció una disminución significativa de la tasa intrínseca de incremento de este artrópodo, como consecuencia de la reducción de huevos puestos por los especímenes colocados en plantas que fueron parte del tratamiento. En este



estudio, la ovoposición de las hembras ubicadas en plantas tratadas fue de  $25\pm 2$  huevos por día, mientras que en las plantas control fue de  $33\pm 2$ , efecto que se pudo evidenciar también en el presente estudio. Así mismo, en otras investigaciones donde se han demostrado respuestas similares de *T.urticae* ante los tratamientos con  $\beta$ -exotoxinas de *B.thuringiensis*, se observó que la *thuringiensin* provocaba modificaciones en la fecundación del ácaro rojo, generando una reducción en esta posterior a los dos días (Vargas, 2001); mientras que el estudio de Hoy & Ouyang, 1987 reveló de la misma forma que la *thuringiensin* generó un decremento en la producción de huevos para el depredador *T.pacificus* y el hervíboro *T.urticae*.

Por otro lado, los amplicones de con los cebadores para Cry 1, 2, 3 y 4 tras la secuenciación Sanger, dieron como resultado la identificación de tres genes: Cry 1Ba2, Cry 2Aa y Cry 4A. A pesar de que se obtuvo un amplicón para el gen Cry 3, el fragmento obtenido no presentaba el peso señalado anteriormente en la Tabla 4 del acápite de procedimientos (Anexo 5); y mediante la secuenciación y el análisis en el software Geneious® se evidenció una complementariedad inespecífica por parte de los cebadores a la secuencia del genoma bacteriano; aludiéndose a que la bacteria probablemente carece de este gen.

Actualmente no se han realizado estudios sobre el efecto acaricida contra *T.urticae* de estas proteínas Cry; sin embargo, se ha evidenciado su efecto en distintos modelos de insectos. En el caso de la proteína Cry 1Ba2, se ha observado que no posee influencia negativa en la eclosión de huevos, supervivencia larvaria, ovoposición, tiempo de desarrollo, y emergencia de adultos de *Cotesia plutellae* y *Diadegma semiclausum* cuando estos parasitoides fueron alimentados con la plaga hervíboro *Plutella xylostella* expuesta a la proteína Cry. *P. xylostella* tampoco mostró alteraciones con respecto a los parámetros de tabla de vida. Por otra parte, se ha observado que la proteína Cry 2Aa posee un efecto positivo en el control de *Helicoverpa amigera*, provocando entre el 80-100% de mortalidad de las larvas (Singh,

2018). Igualmente, se ha observado que la proteína Cry 2Aa posee impacto en la mortalidad del lepidóptero *Ostrinia nubilalis* a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Hilbeck, Moar, Puzsai-Carey, Filippini, & Bigler, 1999). En adición a esto, otros estudios han demostrado que la proteína Cry 2Aa influye la letalidad de las polillas *Chrysodeixis includens* y *Anticarsia gemmatalis*, lo que ha demostrado que estas especies son susceptibles a esta toxina (Bel, Sheets, Tan, Narva, & Escriche, 2017). Por último, de la proteína Cry 4A se conoce su efecto larvicida en mosquitos (López Pazos, 2007); observándose que tiene la capacidad de actuar en sinergia con las proteínas Cry 4B, Cry 10Aa, Cry 11Aa y Cyt 1A (Hilbeck & Otto, 2015). Además, se ha registrado que la toxina Cry 4 provocó una mortalidad del 100% después de una exposición de 3 a 6 días al áfido *Acyrtosiphon pisum* (Porcar, Grenier, Federici, & Rahbé, 2009). Al ser este el primer estudio del efecto acaricida generado por *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* contra *T.urticae*, este podría representar un punto de partida para la investigación de las proteínas detectadas en la bacteria con respecto a su interacción con el ácaro rojo; con el fin de comprobar si los efectos larvicida y ninficida, junto a la reducción en ovoposición se deben a la acción individual o sinérgica de estas toxinas.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Los análisis de calidad y pureza del bioproducto a base de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* demostraron que el bioinsumo cumple con los estándares requeridos por la normativa; presentando una pureza del 99% y concentración de  $1,03 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>.

Se determinó que los estadios más vulnerables al efecto acaricida de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* fueron el de larva y protoninfa; mientras que en los huevos y los especímenes adultos no se evidenció impacto alguno por parte del biocontrolador. Sin embargo, se apreció un efecto subletal en los adultos; el cual consistió en una disminución significativa en la ovoposición.

Las concentraciones evaluadas durante los ensayos demostraron un efecto larvicida y ninficida, que no presentó diferencias significativas entre concentraciones. Sin embargo, para que el biocontrolador forme parte de un programa de manejo integrado de plagas, lo óptimo es emplear la concentración mínima que conserve el efecto acaricida; por lo que en este caso la dosis adecuada es de 5g.L<sup>-1</sup>.

### 5.2. Recomendaciones

Se recomienda confirmar la producción de  $\beta$ -exotoxina por parte de la cepa *B.thuringiensis* var. *thuringiensis* examinada mediante técnicas de biología molecular, y posteriormente, proceder a su aislamiento para verificar su efectividad a través de bioensayos de manera individual para cada uno de los estadios que fueron evaluados durante este estudio.

Se recomienda que a partir de este estudio se continúe con el seguimiento del efecto acaricida de las proteínas Cry 1Ba2, Cry 2Aa y Cry4A aisladas de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*; con el fin de demostrar el aporte particular de cada toxina para el efecto acaricida de la bacteria, y cómo modifican el desarrollo de este durante los diferentes estadios del ácaro rojo. Este conocimiento permitiría adoptar nuevas medidas dentro del manejo integrado de plagas que involucren a estas biomoléculas.

Así mismo, se recomienda llevar a cabo estudios de herencia de alelos de resistencia para el biocontrolador en la población de ácaros estudiada, de manera que se pueda especificar si la concentración tiene impacto en el desarrollo de la resistencia y si esta se encuentra de manera dominante o recesiva.

Se recomienda de igual manera, considerar la ejecución de estudios tritróficos que involucren parasitoides y depredadores naturales de *T. urticae*, con el fin de conocer el impacto que el biocontrolador puede tener dentro de la cadena alimenticia del ecosistema al que será expuesto, y si es inocuo o no para estos organismos.

Se recomienda llevar a cabo pruebas de compatibilidad de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* con pesticidas químicos y otros biocontroladores, debido a que es necesario verificar si la acción del bioproducto es alterada por la presencia de otros plaguicidas o biocontroladores; o si en su defecto provee algún efecto de sinergismo.

## REFERENCIAS

- Abbott, W. S. (1925). *A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide*. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267.  
<https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Agrocalidad. (2012). Fitosanidad. Resolución 0176. Recuperado 18 de enero de 2018 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2014/12/RESOLUCI%C3%93N-Y-ANEXO-TECNICO-DEL-PROTOCOLO-DE-%C3%81CAROS.pdf>
- Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). *Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards*. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Anju Agrawal, , Ravi S. Pandey, & , Bechan Sharma. (2010). *Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India*. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2010.25050>
- Bechtel, D. B., & Bulla, L. A. (1982). *Ultrastructural analysis of membrane development during Bacillus thuringiensis Sporulation*. *Journal of Ultrastructure Research*, 79(2), 121-132.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(82\)90024-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(82)90024-7)
- Bel, Y., Sheets, J. J., Tan, S. Y., Narva, K. E., & Escriche, B. (2017). *Toxicity and Binding Studies of Bacillus thuringiensis Cry1Ac, Cry1F, Cry1C, and Cry2A Proteins in the Soybean Pests Anticarsia gemmatalis and Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens*. *Applied and environmental microbiology*, 83(11), e00326-17.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00326-17>

- Biondi, A., Zappalà, L., Stark, J. D., & Desneux, N. (2013). *Do Biopesticides Affect the Demographic Traits of a Parasitoid Wasp and Its Biocontrol Services through Sublethal Effects?* PLOS ONE, 8(9), e76548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076548>
- Bolognesi, C. (2003). *Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies*. Reviews in Mutation Research, 543(3), 251-272. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Casey, C., Newman, J. P., Robb, K. L., Tjosvold, S. A., MacDonald, J. D., & Parrella, M. P. T.-I. *program successful in C. greenhouse cut roses. (2007). IPM program successful in California greenhouse cut roses.* California Agriculture, 61(2), 71-78.
- Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., & Ferré, J. (2016). *Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 80(2), 329-350. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-15>
- Chapman, M. H., & Hoy, M. A. (1991). *Relative toxicity of Bacillus thuringiensis var. tenebrionis to the two-spotted spider mite (Tetranychus urticae Koch) and its predator Metaseiulus occidentalis (Nesbitt) (Acari, Tetranychidae and Phytoseiidae)*. Journal of Applied Entomology, 111(1-5), 147-154. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1991.tb00305.x>
- Dent, D. R. (1993). *The use of Bacillus thuringiensis as an insecticide*. En D. G. Jones (Ed.), Exploitation of Microorganisms (pp. 19-44). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1532-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1532-2_2)

- Dutton, A., Klein, H., Romeis, J., & Bigler, F. (2002). *Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology*, 27(4), 441-447. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00436.x>
- Dutton, Anna, Klein, H., Romeis, J., & Bigler, F. (2003). *Prey-mediated effects of Bacillus thuringiensis spray on the predator Chrysoperla carnea in maize*. *Biological Control*, 26(2), 209-215. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00127-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00127-5)
- George, Z., & Crickmore, N. (2012). *Bacillus thuringiensis Applications in Agriculture*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2-2>
- Gilden Robyn C., Huffling Katie, & Sattler Barbara. (2010). *Pesticides and Health Risks*. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 39(1), 103-110. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6909.2009.01092.x>
- Grbic Miodrag, Khila Abderrahman, Lee Kwang-Zin, Bjelica Anica, Grbic Vojislava, Whistlecraft Jay, ... Nagy Lisa. (2007). *Mity model: Tetranychus urticae, a candidate for chelicerate model organism*. *BioEssays*, 29(5), 489-496. <https://doi.org/10.1002/bies.20564>
- Guo, Y.-Y., Tian, J.-C., Shi, W.-P., Dong, X.-H., Romeis, J., Naranjo, S. E., ... Shelton, A. M. (2016). *The interaction of two-spotted spider mites, Tetranychus urticae Koch, with Cry protein production and predation by Amblyseius andersoni (Chant) in Cry1Ac/Cry2Ab cotton and Cry1F maize*. *Transgenic Research*, 25(1), 33-44. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9917-1>

- Haque, M., Jyoti, Singh, N. K., & Rath, S. S. (2014). *Effect of Various Acaricides on Hatchability of Eggs of Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BioMed Research International*, 2014, 425423. <https://doi.org/10.1155/2014/425423>
- Hilbeck, A., Moar, W. J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A., & Bigler, F. (1999). *Prey-mediated effects of Cry1Ab toxin and protoxin and Cry2A protoxin on the predator Chrysoperla carnea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91(2), 305-316. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00497.x>
- Hilbeck, A., & Otto, M. (2015). *Specificity and Combinatorial Effects of Bacillus Thuringiensis Cry Toxins in the Context of GMO Environmental Risk Assessment*. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 71. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00071>
- Hoy, M. A., & Ouyang, Y.-L. (1987). *Toxicity of the  $\beta$ -exotoxin of Bacillus thuringiensis to Tetranychus pacificus and Metaseiulus occidentalis (Acari: Tetranychidae and Phytoseiidae)*. *Journal of Economic Entomology*, 80(2), 507-511. <https://doi.org/10.1093/jee/80.2.507>
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis: A genomics and proteomics perspective*. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31-50. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>
- Jurat-Fuentes, J. L., & Jackson, T. A. (2012). *Chapter 8 - Bacterial Entomopathogens A2* - Vega, Fernando E. En H. K. Kaya (Ed.), *Insect Pathology (Second Edition)* (pp. 265-349). San Diego:



Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00008-7>

- Kumari, S., Chauhan, U., Kumari, A., & Nadda, G. (2017). *Comparative toxicities of novel and conventional acaricides against different stages of Tetranychus urticae Koch (Acarina: Tetranychidae)*. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 16(2), 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.06.003>
- Liu, X., Ruan, L., Peng, D., Li, L., Sun, M., & Yu, Z. (2014). *Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from Bacillus thuringiensis with insecticidal activity against a wide range of insects*. Toxins, 6(8), 2229-2238. <https://doi.org/10.3390/toxins6082229>
- LÓPEZ PAZOS, S. (2007). *Three-dimensional structure of Bacillus thuringiensis Toxins: a review*. Acta Biológica Colombiana, 12, 19-32.
- López, S. L., Aiassa, D., Benítez-Leite, S., Lajmanovich, R., Mañas, F., Poletta, G., ... Carrasco, A. E. (2012). *Chapter Two - Pesticides Used in South American GMO-Based Agriculture: A Review of Their Effects on Humans and Animal Models*. En J. C. Fishbein (Ed.), Advances in Molecular Toxicology (Vol. 6, pp. 41-75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59389-4.00002-1>
- Moretto, A., & Colosio, C. (2011). *Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: The example of Parkinson's disease*. NeuroToxicology, 32(4), 383-391. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.03.004>

- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- Porcar, M., Grenier, A.-M., Federici, B., & Rahbé, Y. (2009). *Effects of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins on the pea aphid (Acyrtosiphon pisum)*. *Applied and environmental microbiology*, 75(14), 4897-4900. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-09>
- Prokopy, R., & Kogan, M. (2009). Chapter 139 - *Integrated Pest Management* A2 - Resh, Vincent H. En R. T. Cardé (Ed.), *Encyclopedia of Insects (Second Edition)* (pp. 523-528). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00148-X>
- Rabinovitch, L., Vivoni, A. M., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, D. L., Polanczyk, R. A., & Fiuza, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. En L. M. Fiuza, R. A. Polanczyk, & N. Crickmore (Eds.), *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol* (pp. 1-18). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_1)
- Royalty, Nate, R. Hall, Franklin, & A. J., Taylor R. (1990). *Effects of Thuringiensin on Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) Mortality, Fecundity, and Feeding*, 83. <https://doi.org/10.1093/jee/83.3.792>

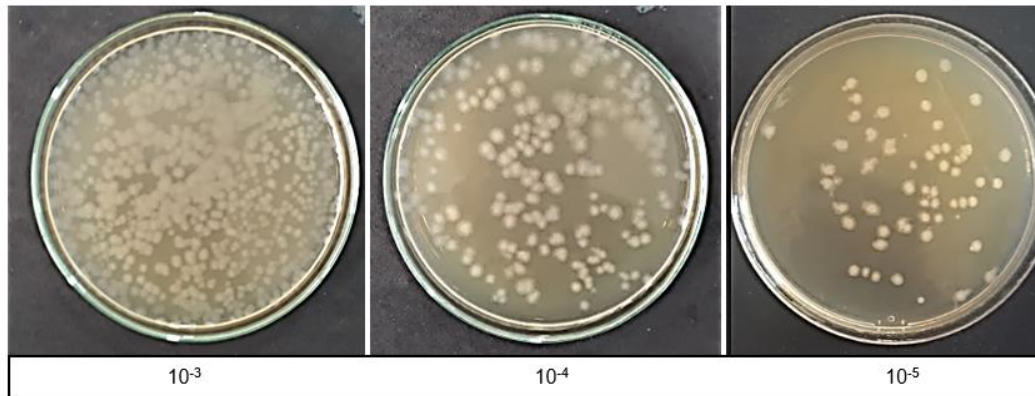
- Rusch, A., Valantin-Morison, M., Sarthou, J.-P., & Roger-Estrade, J. (2010). *Chapter six - Biological Control of Insect Pests in Agroecosystems: Effects of Crop Management, Farming Systems, and Seminatural Habitats at the Landscape Scale: A Review*. En D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 109, pp. 219-259). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385040-9.00006-2>
- Salama, H. S., Abd El-Ghany, N. M., & Saker, M. M. (2015). *Diversity of Bacillus thuringiensis isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.10.001>
- Sayyed, A. H., Omar, D., & Wright, D. J. (2004). *Genetics of spinosad resistance in a multi-resistant field-selected population of Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 60(8), 827-832. <https://doi.org/10.1002/ps.869>
- Shu, Y., Romeis, J., & Meissle, M. (2018). *No Interactions of Stacked Bt Maize with the Non-target Aphid Rhopalosiphum padi and the Spider Mite Tetranychus urticae*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 39. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00039>
- Siegwart, M., Graillet, B., Blachere Lopez, C., Besse, S., Bardin, M., Nicot, P. C., & Lopez-Ferber, M. (2015). *Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 381. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00381>

- Singh, S., Kumar, N. R., Maniraj, R., Lakshmikanth, R., Rao, K. Y. S., Muralimohan, N., ... Sreevathsa, R. (2018). Expression of Cry2Aa, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in transgenic pigeon pea confers resistance to gram pod borer, *Helicoverpa armigera*. *Scientific reports*, 8(1), 8820-8820. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26358-9>
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005, septiembre). *Gram stain protocols*. Recuperado en 10 de marzo de 2018 de <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2886>
- Surendra Dara. (2011, septiembre 15). *Twospotted spider mite and Lewis mite: A comparison*. Recuperado de [http://cesantabarbara.ucanr.edu/Strawberry\\_Production/?blogasset=63881&blogstart=88](http://cesantabarbara.ucanr.edu/Strawberry_Production/?blogasset=63881&blogstart=88) en 16 de abril de 2018
- Vargas, R., Chapman, B., & Penman, D. R. (2001). *Toxicity of thuringiensin on immature and adult stages of Tetranychus urticae Koch and Panonychus ulmi (Koch) (Acarina: Tetranychidae)*. *Agricultura Técnica*, 61, 3-14.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., & Bulla, L. A. (2006). *A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9897-9902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604017103>

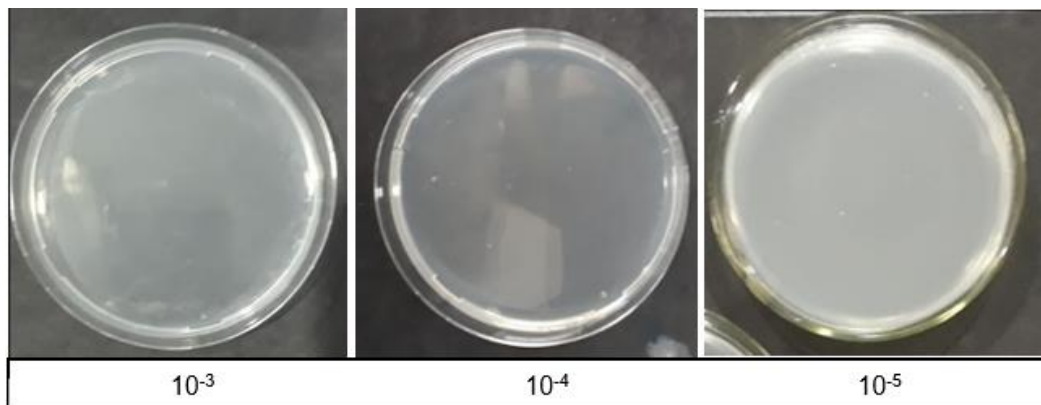
Zhu, Y. J., Sengonca, C., & Liu, B. (2005). Toxicity of biocide GCSC-BtA on arthropod pests under different temperature conditions. *Journal of Pest Science*, 79(2), 89. <https://doi.org/10.1007/s10340-005-0118-1>

## ANEXOS

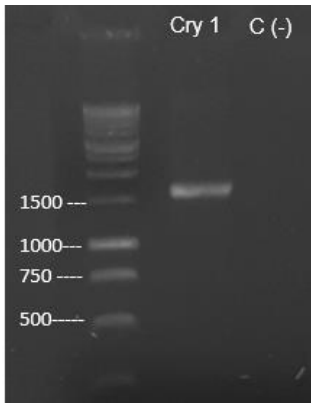
**Anexo 1.** Placas de agar nutriente empleadas en una de las repeticiones para conteo de UFC en el análisis de concentración de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* con su respectiva dilución



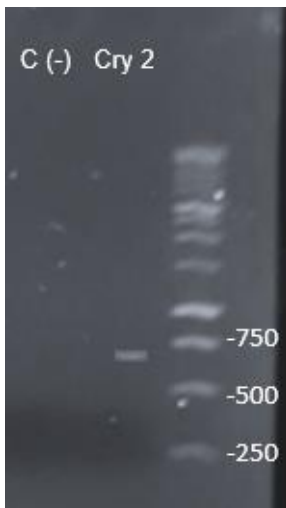
**Anexo 2.** Placas de PDA y antibiótico utilizadas para el análisis de pureza de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* con su respectiva dilución



**Anexo 3.** Gel de electroforesis con el amplicón del gen Cry 1 y su control negativo (Ladder 1kb)

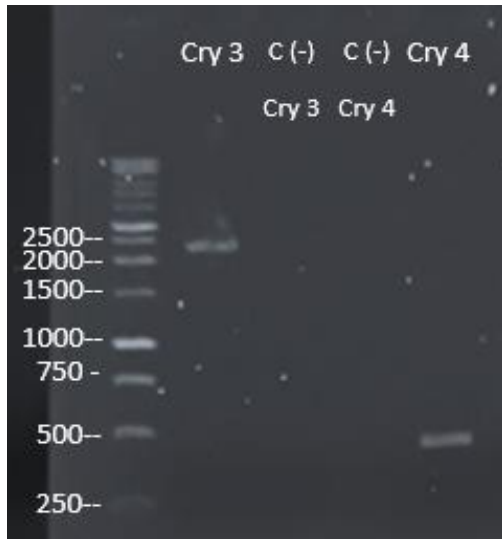


**Anexo 4.** Gel de electroforesis con el amplicón del gen Cry 2 y su control negativo (Ladder 1kb)



**Anexo 5.** Gel de electroforesis con los amplicones de los primers Cry 3 y 4 con sus respectivos controles negativos (Ladder 1kb)





**Anexo 6.** Secuencia consenso obtenida tras análisis con el software Genious® para gen Cry 1

5' -

TATCCAATAATACGAGTGCTCAGTTAACAAGAGAAGTTTATACAGACCCAATTGGAGCAACAGGGGTAAA  
TATGGCAAGTATGAATTGGTATAATAATAATGCACCTTCGTTCTCTGCCATAGAGGCTGCGGCTATCCGA  
AGCCCGCATCTACTTGATTTTCTAGAACAACCTTACAATTTTTTAGCGCTTCATCACGATGGAGTAATACTA  
GGCATATGACTTATTGGCGGGGGCACACGATTCAATCTCGGCCAATAGGAGGGCGGATTAAATACCTCAAC  
GCATGGGGCTACCAATACTTCTATTAATCCTGTAACATTACGGTTCGCATCTCGAGACGTTTATAGGACT  
GAATCATATGCAGGAGTGCTTCTATGGGGAATTTACCTTGAACCTATTCATGGTGTCCCTACTGTTAGGT  
TTAATTTTACGAACCCTCAGAAATTTCTGATAGAGGTACCNGCTAACTATAGTCAACCTTATGAGTCAC  
CTGGGCTTCAATTTAAAAGATTCAGAAACTGAATTACCANCCAGAAACAACAGAACGACCAAATTTATGAAT  
CTTACAGTCACAGGTTATCTCATATAGGTATAATTTTACAATCCAGGGTGAATGTACCGGTATATTTCTTG  
GACGCATCGTAGTGCAGATCGTACGAATACGATTGGACCAAATAGAATCACCCAAATCCCAATGGTAAAA  
GCATCCGAACCTCCTCAAGGTACCACCTGTTGTTAGAGGACCAGGATTTACTGGTGGGGATATTTCTTCGAA  
GAACGAATACTGGTGGATTTGGACCGATAAGAGTAACTGTTAACGGACCATTAACACAAAGATATCGTAT  
AGGATTCGGCTATGCTTCAACTGTAGATTTTGATTTCTTTGTATCACGTGGAGGTACTACTGTAAATAAT  
TTTAGATTCCTACGTACAATGAACAGTGGAGACGAACTAAAATACGGAAATTTTGTGAGACGTGCTTTTA  
CTACACCTTTTACTTTTACACAAAATCAAGATATAATTCGAACGTCTATTCAAGGCCTTAGTGAAATGG  
GGAAGTGTATATAGATAAAAATTGAAATTTATCCAGTTACTGCAACCTTCGAAGCAGAATATGATTTAGAA  
AGAGCGCAAGAGGCGGTGAATGCTCTGTTTACTAATACGAATCCAAGAAGATTGAAAACAGATGTGACAG  
ATTATCATATTGATCAAGTATCCAATTTAGTGGCGTGTTTATCGGATGAATTTCTGCTTGGATGAAAAGAG  
AGAATTACTTGAGAAAAGTAAAATATGCGAAACGACTCAGTGATGAAAGAACTTACTCCAAGATCCAAC  
TTCACATCCATCAATAAGCAACCAGACTTCATATCTACTAATGAGCAATCGAATTTTACATCTATCCATG

AACAATCTGAACATGGATGGTGGGGAAGTGAGAACATTACCATCCAGGAAGGAAATGACGTATTTAAAGA  
GAATTACGTCACACTACCGGGTACTTTTAATGAGTGTTATCCGACGTATTTATATCAAAAAATAGGGGAG  
TCGGAATTAAAA-3'

## Anexo 7. Secuencia obtenida tras análisis con el software Genious® para gen Cry 2

5' -

AGCACATTACGTACGTATCGAGATTACCTGAGAAATTATACAAGAGATTATTCTAATTATTGTATAAATA  
CGTATCAAACCTGCGTTTAAAGGGTTAAACACCCGTTTACACGATATGTTAGAATTTAGAACATATATGTT  
TTTAAATGTATTTGAATATGTATCTATTTGGTCATTGTTTAAATATCAAAGTCTTATGGTATCTTCTGGC  
GCTAATTTATATGCTAGCGGTAGTGGACCACAGCAGACACAATCATTTACATCACAAAACCTGGCCATTTT  
TATATTCTCTTTTCCAAGTTAATTCAAATTATATATTATCTGGAATTAGTGGTACTAGGCTTTCTATTAC  
CTTCCCTAATATTGGTGGTTTACCTGGTACTACTACAACCTACTTCATTGCAATGCTGCAAGGGTTTAAAT  
TACTAGTGGGAGGAATTTTCATCTGGTGCATCATAGGTGGCATACTACGTCTTCAATCAACAATCTTTTA  
ATTTGTCAGCCACATGTTCTCCCCCTCCCATTTGATTCAAACGACCCATTTTTGTTTAAAGGAAGGTTTG  
GGCTAGGAATTTCCAGGGGTACAAGA-3'

## Anexo 8. Secuencia consenso obtenida tras análisis con el software Genious® para gen Cry 4

5'-

CGAAACAAGCCATTGATGCTTTATTTCACAAATGTACAAGATGAGGCTTTACAGTTTGATACGAC  
ACTCGCTCAAATTCAGTACGCTGAGTATTTGGTACAATCGATTCCATATGTGTACAATGATTGG  
TTGTCAGATGTTCCAGGTATGAATTATGATATCTATGTAGAGTTGGATGCACGAGTGGCACAAG  
CGGTTATTTGTATGATACAAGAAATATTATTAATAAATGGTGATTTTACACAAGGGGTAATGGG  
GTGGCATGTAACCTGGAAATGCAGACGTACAACAAATAGATGGTGTCTGTATTGGTTCTATCT  
AATTGGAGTGCTGGCGTATCTCAAATGTCCATCTCCAACATAATCATGGGTATGTCTTACGTG  
TTATTGCCAAAAAAGAAGGACCTGGAAAT-3'

## Anexo 9. Alineamiento de la de la secuencia de Cry 3 obtenida por secuenciación Sanger con secuencia para el gen Cry 3 de GenBank



