

Estudio de la ecología de
Bacillus thuringiensis en la hoja

Estudio de la ecología de *Bacillus thuringiensis* en la hoja

Memoria presentada por Pau Maduell Soler para conseguir el título de doctor en Microbiología por la Facultad de Biociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona

Bellaterra, septiembre de 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA DE
Bacillus thuringiensis EN LA HOJA**

Memoria presentada por el
Licenciado en Biología Pau
Maduell Soler para optar al
grado de Doctor en Ciencias
Biológicas por la Universidad
Autónoma de Barcelona.

Con el Vº Bº de la Directora

Dra. Montserrat Llagostera Casas

BARCELONA 2007

AGRADECIMIENTOS

INDICE

	Página
Resumen	9
Summary	11
1. Introducción	13
1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
1.2. Marco histórico	14
1.3. Mecanismo de acción	16
1.4. Identificación y caracterización de <i>B. thuringiensis</i>	18
1.5. Ecología de <i>B. thuringiensis</i>	20
1.6. Modelos vegetales	24
2. Objetivos	27
3. Artículos	29
3.1. Artículo I	30
3.2. Artículo II	31
3.3. Artículo III	32
3.4. Artículo IV	33
4. Materiales y métodos	34
4.1. Distribución y caracterización de <i>B. thuringiensis</i> en el filoplano de especies de <i>Piper</i> (<i>Piperaceae</i>) en tres estratos altitudinales (artículo I)	35
4.2. Diversidad de cepas de <i>B. thuringiensis</i> en el filoplano de maíz y fríjol y en sus respectivos suelos en Colombia (artículo II)	41
4.3. Migración de <i>B. thuringiensis</i> a hojas de fríjol desde el suelo o desde hojas distantes (artículo III)	45
4.4. Determinación de la capacidad de <i>B. thuringiensis</i> de colonizar la superficie de las hojas (artículo IV)	49
4.5. Capacidad de <i>B. thuringiensis</i> de crecer <i>in vitro</i> en medios que simulan el medio ambiente de la hoja (artículos III y IV)	52
5. Resultados y discusión	54
5.1. Distribución y caracterización de <i>B. thuringiensis</i> en el filoplano de especies de <i>Piper</i> (<i>Piperaceae</i>) en tres estratos altitudinales (artículo I)	55

5.2. Diversidad de cepas de <i>B. thuringiensis</i> en el filoplano de maíz y frijol y en sus respectivos suelos en Colombia (artículo II)	60
5.3. Migración de <i>B. thuringiensis</i> a hojas de frijol desde el suelo o desde hojas distantes (artículo III)	67
5.4. Determinación de la capacidad de <i>B. thuringiensis</i> de colonizar la superficie de las hojas (artículo IV)	70
5.5. Capacidad de <i>B. thuringiensis</i> de crecer <i>in vitro</i> en medios que simulan el medio ambiente de la hoja (artículos III y IV)	76
5.6. Consideraciones generales acerca de la ecología de <i>B. thuringiensis</i> en el filoplano	80
6. Conclusiones	84
7. Bibliografía	87

RESUMEN

La ecología de *Bacillus thuringiensis*, un bioinsecticida muy común, es poco conocida. Nuestro principal objetivo era investigar acerca de la ecología de esta bacteria en la filósfera. En un primer estudio se recogieron 35 muestras de hojas del género *Piper* de bosques andinos colombianos. Se obtuvieron 256 aislamientos de *B. thuringiensis* del 74% de las muestras estudiadas. Los aislamientos fueron caracterizados según la morfología del cristal, la presencia de genes *cry* por PCR y la toxicidad contra insectos. Además, se estimaron las poblaciones de células vegetativas viables y endosporas por unidad de área obteniéndose $2-5 \times 10^3$ cfu/cm² de hoja. En general, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de aislamientos de *B. thuringiensis* por cm² de hoja ni en las características de los aislamientos de *B. thuringiensis* entre las diferentes especies de *Piper*. Después de comprobar que *B. thuringiensis* estaba presente en el filoplano, se quiso comparar las poblaciones de esta bacteria en el suelo y en las hojas. Se aisló *B. thuringiensis* del filoplano y del suelo de cultivos de maíz y fríjol. Se recuperaron 214 aislamientos de 96 muestras de filoplano (0-34 cfu/cm²) y 59 aislamientos de 24 muestras de suelo. Todos los aislamientos fueron caracterizados como se ha explicado anteriormente. Las poblaciones predominantes de *B. thuringiensis* en el filoplano contenían genes *cryI* y eran activas contra *Spodoptera frugiperda*, mientras que los aislamientos del suelo tenían genes *cryII* y eran activos contra *Culex quinquefasciatus*. El hecho de que predominaran poblaciones específicas de *B. thuringiensis* en las hojas diferentes a las del suelo sugiere que existe una selección diferencial en las poblaciones de *B. thuringiensis* en el filoplano y en el suelo. Entonces, se investigó la capacidad de migración de *B. thuringiensis* desde el suelo a las hojas. Se inocularon dos cepas diferentes de *B. thuringiensis* en suelos, semillas y hojas jóvenes de plantas de fríjol, para determinar si

podían migrar a las hojas superiores en condiciones controladas. Aunque se recuperaron aislamientos de *B. thuringiensis* en las hojas, las poblaciones fueron muy bajas (menos de 10 cfu/cm² de hoja). Además el número de células recuperado disminuía a medida que las hojas estaban más distantes del suelo o de las hojas inoculadas. Todo esto indicaba que *B. thuringiensis* migra pobremente desde el suelo o la semilla a las hojas o entre hojas de la misma planta. También se evaluó la capacidad de varias cepas de *B. thuringiensis* de colonizar la superficie de las plantas y se comparó con otras bacterias epífitas. Mientras que todas las cepas de *B. thuringiensis* se multiplicaron en cierta medida después de la inoculación sobre hojas de fríjol, las poblaciones máximas alcanzadas fueron de 10⁶ cfu/g de hoja, muy inferiores a las conseguidas por otras bacteria epífitas, como *Pseudomonas fluorescens*. Muy poco tiempo después de la inoculación, una porción importante de las células de *B. thuringiensis* estaban en forma de endospora. Además el crecimiento de *B. thuringiensis* no se vio afectado por la presencia de *Pseudomonas* spp. cuando fueron co-inoculados y viceversa. Por otro lado, cuando se observaron al microscopio las cepas de *B. thuringiensis* (marcadas con el gen de la proteína verde fluorescente) sobre hojas de fríjol, se observó que no formaban agregados celulares y no estaban asociadas con otras bacterias epífitas ni con estructuras de la hoja. Finalmente se investigó la capacidad de *B. thuringiensis* de crecer en un medio diseñado para simular la composición de nutrientes del filoplano. Sin embargo el crecimiento fue inferior al de otras bacterias. Aparentemente, *B. thuringiensis* tiene unos requisitos nutricionales mayores que otras especies bacterianas habitantes naturales del filoplano.

SUMMARY

The ecology of *Bacillus thuringiensis*, a common biopesticide, is poorly understood. Our main objective was to investigate the ecology of this bacteria on the phylloplane. In a first study 35 leaf samples of the genus *Piper* were collected from the Colombian Andean forest. Two hundred and fifty-six isolates of *B. thuringiensis* were obtained from 74% of the samples studied. The isolates were characterized by crystal morphology, the presence of *cry* genes by PCR and toxicity against insects. The populations of viable vegetative cells and spores per unit area were estimated ($2-5 \times 10^3$ cfu/cm² of leaf). Overall, no significant differences in the number of *B. thuringiensis* isolates per cm² of leaf nor in the *B. thuringiensis* characteristics were found among the different *Piper* species evaluated. After observing *B. thuringiensis* on the phylloplane, a comparison was performed between soil and leaf populations. *B. thuringiensis* was isolated from the phylloplane and soil in plantings of maize and bean from Colombia; and 214 isolates were recovered from 96 phylloplane samples (0-34 cfu/cm²) while 59 isolates from 24 soil samples. All the isolates were characterized as above-mentioned. The predominant population of *B. thuringiensis* on the phylloplane harbored *cryI* gene and was active against *Spodoptera frugiperda*, whereas in soil the isolates harboring *cryII* gene and active against *Culex quinquefasciatus* predominated. The predominance of specific *B. thuringiensis* populations both on the leaves and in the soil, suggests the presence of differential selection in *B. thuringiensis* populations on the phylloplane and in soil. Then, we addressed the process of immigration of *B. thuringiensis* from soil to leaves. Two different *B. thuringiensis* strains were inoculated into soils, onto seeds or onto lower leaves of bean plants to determine if they were able to disperse to upper leaves under controlled conditions. While *B. thuringiensis* isolates were commonly recovered from leaves exposed to such inocula, populations were very low (less than 10

cfu/cm² of leaf). In addition, the number of cells of *B. thuringiensis* recovered decreased with increasing distance from the soil or from the inoculated leaves. This indicates that *B. thuringiensis* disperses poorly from the soil or the seed to the leaves or between leaves of the same plant under controlled conditions. Moreover, the ability of several *B. thuringiensis* strains to colonize plant surfaces was assessed and compared with that of more common epiphytic bacteria. While all *B. thuringiensis* strains multiplied to some extent after inoculation on bean plants, their maximum epiphytic population sizes of 10⁶ cfu/g of leaf were always much less than that achieved by other resident epiphytic bacteria or an epiphytically fit *Pseudomonas fluorescens* strain. Many cells were in a spore form soon after inoculation onto plants. The growth of *B. thuringiensis* was not affected by the presence of *Pseudomonas syringae* spp. when co-inoculated, and vice versa. *B. thuringiensis* strains harboring a green fluorescent protein marker gene did not form large cell aggregates, were not associated with other epiphytic bacteria, and were not found associated with leaf structures when directly observed on bean leaves by epifluorescent microscopy. Finally, we analyzed the capacity of *B. thuringiensis* to grow on a medium designed to simulate the nutrient composition of the phylloplane but the growth observed was very poor compared to other bacteria. This bacterium apparently has greater nutrient requirements than other bacterial species that are prominent inhabitants of the phylloplane.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva con la capacidad de esporular. Es muy semejante a otras especies del género *Bacillus*, como *B. cereus* y *B. anthracis*, pero se diferencia de ellas por la formación de un cristal proteico en el momento de la esporulación (Schnepf *et al.*, 1998). El cristal está compuesto por proteínas, algunas de las cuales son extremadamente tóxicas contra insectos, principalmente de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera*; mientras que los mamíferos, incluido el hombre, no se ven afectados (Siegel, 2001). Cabe destacar que gran parte de las plagas agrícolas y forestales son provocadas por insectos de los órdenes *Lepidoptera* y *Coleoptera*, y que la mayoría de los vectores de enfermedades humanas son del orden *Diptera* (Blas y Vives, 1987). Además, estas proteínas son biodegradables, por lo que no contaminan suelos ni aguas. Por estos motivos, esta bacteria está siendo utilizada como una alternativa ecológicamente sostenible a los insecticidas químicos para controlar plagas agrícolas, plagas forestales y vectores de enfermedades (Whalon y Wingerd, 2003).

1.2. Marco histórico

B. thuringiensis fue aislado por primera vez en Japón por Ishiwata en 1901 como patógeno del gusano de seda, *Bombyx mori* (*Lepidoptera*, *Bombycidae*), causándole la enfermedad de sotto (Ishiwata, 1901). En 1911 Berliner, en Alemania, aisló la misma bacteria a partir de larvas del lepidóptero *Anagasta kuehniella* (*Lepidoptera*, *Pyrallidae*), la palomilla de la harina del Mediterráneo, e hizo una descripción formal de esta bacteria: bacilo Gram positivo, que presenta un cristal paraesporal de naturaleza proteica, endospora y flagelos peritricos, en distintas fases de su ciclo de crecimiento. La denominó *Bacillus thuringiensis*, en honor a la región alemana de donde la aisló: Thuringia (Berliner, 1915).

El uso de *B. thuringiensis* para el control de insectos se inició en los años 30 contra el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (*Lepidoptera, Pyralidae*). El primer producto comercial salió en Francia en 1938 bajo el nombre de Sporeine®; en EEUU se comercializó por primera vez en 1957, bajo el nombre de Thuricide®. Desde entonces se ha desarrollado la producción de forma masiva en varios países de todo el mundo (Whalon y Wingerd, 2003).

En 1970 Dulmage descubrió la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* en EEUU a partir de larvas enfermas de lepidópteros. Esta serovariedad resultó ser entre 2 y 200 veces más tóxica que las variedades anteriormente utilizadas en la producción comercial de bioinsecticidas. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de EEUU (EPA) la designó como estándar de potencia o unidad internacional de toxicidad (van Frankenhuyzen, 1993).

En 1977, dos entomólogos israelíes aislaron un bacilo de larvas del mosquito *Culex* sp., el cual se designó con el nombre de *B. thuringiensis* serovar. *israeliensis*, y fue considerado útil en salud pública para el control de vectores de enfermedades tropicales por ser patógeno de larvas del mosquito *Aedes aegypti* (*Diptera, Culicidae*), vector del dengue (Golberg y Margalit, 1977).

En los años 80 fueron descritas otras cepas de *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* patovariedades *tenebrionis* y *san diego*, activos contra coleópteros (Krieg, 1983). Las serovariedades de mayor impacto a nivel industrial han sido *kurstaki*, *israeliensis* y *morrisoni*, si bien no son las únicas. Desde el descubrimiento e identificación de *B.*

thuringiensis, el interés en esta bacteria ha sido cada vez mayor, tanto que a la fecha se han descrito 83 serovariedades distintas según su antígeno flagelar, en el intento de encontrar nuevas toxinas con nuevas actividades biológicas (Lecadet *et al.*, 1999; Khyami-Horani *et al.*, 2003).

La mayoría de variedades estudiadas actualmente son activas contra larvas de diferentes grupos de lepidópteros, y algunas de ellas también lo son contra dípteros y coleópteros (de Maagd *et al.*, 2001; Whalon y Wingerd, 2003). Algunos estudios han mostrado que *B. thuringiensis* también podría ser utilizado contra insectos de otros órdenes (*Hymenoptera*, *Homoptera* y *Mallophaga*), nemátodos, ácaros y protozoos (Drummond *et al.*, 1995; Zhioua *et al.*, 1999; Raps *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003).

En los últimos años se han desarrollado ampliamente técnicas moleculares que han permitido manipular genes de *B. thuringiensis* para desarrollar bacterias acuáticas recombinantes que forman parte de la dieta de larvas de insectos (Armengol *et al.*, 2005), así como para generar plantas transgénicas para conferirles resistencia a los insectos plaga (Romeis *et al.*, 2006). En el año 2002 ya había 14 millones de ha con plantas trasgénicas con genes de *B. thuringiensis* (Shelton *et al.*, 2002).

1.3. Mecanismo de acción

B. thuringiensis tiene un ciclo de vida que comprende la formación de endosporas cuando las condiciones del medio en el que se encuentra son adversas. La endospora es una forma de resistencia frente a situaciones de estrés ambiental como la desecación o la falta de nutrientes, entre otros. Junto con la endospora también forma un cristal paraesporal constituido por δ -endotoxinas. Cuando estas protoxinas contenidas en el

crystal son ingeridas por las larvas de los insectos susceptibles les causan intoxicación. Las condiciones alcalinas del intestino medio de las larvas y sus enzimas digestivas (principalmente tripsina y quimotripsina) disuelven los cristales y activan las protoxinas por cortes proteolíticos, convirtiéndolas en toxinas. La toxina es reconocida por receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto, se ancla a ella y forma canales iónicos, causando un desequilibrio osmótico y por tanto la lisis celular. Esto provoca en último término la muerte del insecto. Las endosporas de *B. thuringiensis* se mantienen en el canal alimentario, donde, después de una disminución del pH provocada por el desequilibrio osmótico, pueden germinar (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001; Whalon y Wingerd, 2003).

Una característica importante de estas toxinas es su alto grado de especificidad. En la relación toxina-insecto susceptible se han descrito cuatro niveles de especificidad. El primer nivel corresponde a la conducta alimentaria del insecto; éste debe ingerir junto con su alimento las endosporas y los cristales de *B. thuringiensis*. El segundo nivel viene definido por el pH del intestino medio del insecto, que debe ser alcalino, pues la mayoría de los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* se solubilizan a pH alto, excepto en un caso, en el que también solubilizan a pH ácido (Koller *et al.*, 1992). El tercer nivel es debido a las proteasas alcalinas del intestino del insecto; éstas han de ser las adecuadas para poder digerir parcialmente las proteínas, es decir, realizar el paso de protoxina a toxina. Por último, el cuarto nivel de especificidad corresponde a los receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto; las toxinas deben ser reconocidas por los receptores para poder anclarse a la membrana. Además de la unión al receptor, es necesaria la inserción de parte del dominio I de la toxina, la agregación y la formación del canal (Whalon y Wingerd, 2003).

1.4. Identificación y caracterización de *B. thuringiensis*

Los métodos que se utilizan habitualmente para la caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de *B. thuringiensis* son: el serotipo flagelar, la descripción morfológica del cristal paraesporal, la caracterización por métodos moleculares y los bioensayos (Hastowo *et al.*, 1992; Bernhard *et al.*, 1997; Helgason *et al.*, 1998; Iriarte *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Hongyu *et al.*, 2000).

El antígeno flagelar ha sido usado para caracterizar *B. thuringiensis* desde 1962 (de Barjac y Bonnefoi, 1962). Los aislamientos de *B. thuringiensis* son incubados con anticuerpos policlonales de cepas conocidas, los cuales reconocen los antígenos flagelares del bacilo, dándose una reacción de aglutinación específica. Actualmente se conocen 83 serovariedades (Lecadet *et al.*, 1999; Khyami-Horani *et al.*, 2003). Sin embargo, existen algunos trabajos en los que se concluye que no existe una relación clara entre la clasificación por la técnica del antígeno flagelar y las clasificaciones filogenéticas elaboradas mediante marcadores moleculares (Hastowo *et al.*, 1992; Nakamura, 1994; Bourque *et al.*, 1995; Helgason *et al.*, 2000). De todas formas esta técnica sigue considerándose como la única herramienta disponible para identificar las distintas serovariedades de *B. thuringiensis* (Lecadet *et al.*, 1999).

El cristal paraesporal puede presentar varias morfologías: bipiramidal, ovoidal, redondo, cuadrado, triangular, "plate-like" (forma de plato) y amorfo, entre otras (Hastowo *et al.*, 1992; Ohba, 1996; Bernhard *et al.*, 1997). Existe una correlación bastante alta entre la forma del cristal y la actividad tóxica, por ejemplo, los cristales bipiramidales están

generalmente asociados a actividad contra lepidópteros y los cristales redondos están asociados a actividad contra dípteros (Lerecluse *et al.*, 1993; Damgaard, 1996).

Seguramente la técnica más utilizada para caracterizar cepas de *B. thuringiensis* es la PCR (Bourque *et al.*, 1993; Brousseau *et al.*, 1993; Gleave *et al.*, 1993; Ceron *et al.*, 1994; Ceron *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 1998). Usando cebadores específicos de DNA, se pueden identificar los genes que codifican las distintas proteínas que forman los cristales, y así hacer una aproximación de la toxicidad de cada aislamiento. En la actualidad están catalogadas genéticamente más de 350 proteínas cristalinas (Crickmore, 2006).

La composición proteica del cristal puede ser analizada mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). De esta forma se separan las protoxinas según su peso molecular y, comparando con patrones de bandas de los cristales de cepas conocidas, se puede obtener información sobre la posible toxicidad de los cristales de las cepas evaluadas (Kim *et al.*, 1998; Hongyu *et al.*, 2000; Marquez *et al.*, 2000). Esta técnica puede ser complementada combinándola con *Western blot*, en la que los componentes separados electroforéticamente son transferidos a una membrana que se incuba con anticuerpos específicos contra secuencias de aminoácidos conocidas. Así se pueden identificar las protoxinas (Kaelin *et al.*, 1994; Marquez *et al.*, 2000).

Otra técnica importante para estos estudios es la evaluación de la toxicidad de los aislamientos sobre distintas especies de insectos de interés agronómico y para la salud. Estos estudios se denominan bioensayos, en los cuales se alimentan a las especies de

insectos a evaluar con toxinas y endosporas. Existen dos tipos de bioensayos: los cualitativos, que evalúan la patogenicidad con altas concentraciones de la muestra, contando el número de insectos muertos, ya que sólo se pretende ver la efectividad de la muestra como insecticida; y los cuantitativos, en los que se utilizan diversas dosis de toxina para evaluar la cantidad necesaria de toxina con la que se obtiene el 50% de mortalidad del insecto estudiado (Dosis Letal 50 (DL₅₀) y Concentración Letal 50 (CL₅₀)) (Ohba y Aizawa, 1986; Bernhard *et al.*, 1997; Iriarte *et al.*, 1998)

1.5. Ecología de *B. thuringiensis*

Desde el punto de vista ecológico, no se conoce con exactitud cual es el hábitat natural de *B. thuringiensis*. Históricamente se ha buscado en el suelo, donde se ha encontrado abundantemente y por todo el mundo (Martin y Travers, 1989; Bernhard *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1998; Iriarte *et al.*, 1998; Uribe *et al.*, 2003; Armengol *et al.*, 2006); en el suelo persiste principalmente en forma de endospora (Yara *et al.*, 1997). De todas formas también se ha encontrado *B. thuringiensis* en partículas de polvo en suspensión (Martin y Travers, 1989), cuerpos de insectos enfermos o muertos (Porcar y Caballero, 2000), productos almacenados (Meadows *et al.*, 1992; Kaelin y Gadani, 2000), alimentos (Damgaard *et al.*, 1996), piel de animales (Akhurst *et al.*, 1997), sedimentos marinos (Maeda *et al.*, 2000), fangos de depuradora (Mizuki *et al.*, 2001), e incluso como patógeno humano oportunista (Damgaard *et al.*, 1997a). Además, se ha encontrado abundantemente en hojas de plantas (Smith y Couche, 1991; Ohba, 1996; Damgaard *et al.*, 1997b; Damgaard *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1998; Rizali *et al.*, 1998; Mizuki *et al.*, 1999; Kaur y Singh, 2000; Vaid y Bishop, 2000; Nair *et al.*, 2002; Collier *et al.*, 2005).

Los primeros trabajos enfocados al estudio de la ecología de *B. thuringiensis* tenían como objetivo el de analizar la distribución y abundancia de esta especie en el ambiente, principalmente en el suelo. En la década de los 80 se hicieron varios muestreos de suelos de distintas partes del mundo (DeLucca *et al.*, 1981; Padua *et al.*, 1982; Ohba y Aizawa, 1986). En 1989 Martin y Travers (Martin y Travers, 1989) publicaron un trabajo donde analizaron muestras de suelos de todos los continentes. A pesar de encontrar *B. thuringiensis* en todo el mundo, concluyeron que el papel de *B. thuringiensis* en el medio ambiente era un enigma. Después de este trabajo se han realizado varios estudios de búsqueda de *B. thuringiensis* en suelos de diferentes países: Indonesia (Hastowo *et al.*, 1992), Korea (Kim *et al.*, 1998), Noruega (Helgason *et al.*, 1998), México (Bravo *et al.*, 1998), Colombia (Uribe *et al.*, 2003; Armengol *et al.*, 2006) y España (Iriarte *et al.*, 1998), entre otros. De todos estos trabajos se concluye que ésta es una especie cosmopolita.

A principios de la década de los 90, Smith y Couche (1991) publicaron el primer trabajo de búsqueda de *B. thuringiensis* en hojas de árboles. Aislaron *B. thuringiensis* del 50-70% de las hojas muestreadas. Estos autores lanzaron una hipótesis en la que proponían *B. thuringiensis* como comensal o simbiote de las plantas, ofreciendo protección a éstas de los insectos fitófagos. A su vez, las plantas proveerían nutrientes mediante los exudados foliares y además proveerían un nicho libre de competencia con otras bacterias esporogénicas del suelo. Smith y Couche también proponían que se debería determinar si *B. thuringiensis* es metabólicamente activa en el filoplano y examinar las yemas de las plantas para evaluar si son fuentes adicionales de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis*. Los resultados de este estudio sugerían que el papel de *B. thuringiensis* en el medio ambiente debía ser reconsiderado.

Posteriormente, Ohba (1996) buscó *B. thuringiensis* en el filoplano de hojas de morera (*Morus alba*), de la cual se alimenta la larva del gusano de la seda, ampliamente cultivado en Japón. Se encontró *B. thuringiensis* en 24 de los 25 árboles estudiados. No se observaron diferencias entre la cara inferior y la superior de las hojas en cuanto a presencia de *B. thuringiensis*, lo cual era muy inesperado, ya que *B. thuringiensis*, al igual que muchos microorganismos, es susceptible a la radiación ultravioleta del sol (Ignoffo *et al.*, 1977; Burges y Jones, 1998). También se describió que las serovariedades de *B. thuringiensis* encontradas en las hojas de morera eran diferentes de las serovariedades que se habían reportado previamente en los suelos donde se cultivan dichos árboles.

Damgaard *et al.* (1997b) publicaron un trabajo sobre búsqueda de *B. thuringiensis* en hojas de repollo (*Brassica oleracea*). El 64% de los aislamientos de *B. thuringiensis* correspondían a la serovariedad *kurstaki* (tóxica contra lepidópteros). En ninguno de los estudios anteriores de colecciones de *B. thuringiensis* del suelo, la serovariedad *kurstaki* había alcanzado proporciones tan altas. Con esto parecía confirmarse lo que habían sugerido Smith y Couche (1991) y Ohba (1996): las poblaciones de *B. thuringiensis* que se encuentran en las hojas no sólo son producto de la transferencia de bacterias del suelo a las hojas, sino que debe haber una selección de dichas poblaciones en las hojas. En el trabajo de Damgaard *et al.* (1997b) también se aisló *B. thuringiensis* de insectos vivos. Se postuló que algunos insectos pueden soportar una cierta cantidad de individuos de *B. thuringiensis* sin sufrir un perjuicio grave.

Posteriormente se continuaron los trabajos de búsqueda de *B. thuringiensis* en hojas de plantas, en los que se dedicaron a describir las poblaciones de *B. thuringiensis* aisladas de diferentes especies vegetales (Hansen *et al.*, 1998; Kaur y Singh, 2000; Nair *et al.*, 2002). Algunos estudios en hojas de césped y de morera (Damgaard *et al.*, 1998; Rizali *et al.*, 1998) aislaron mayor cantidad de aislamientos de *B. thuringiensis* activos contra dípteros que contra lepidópteros, lo que contradecía la hipótesis que se venía postulando.

En otro trabajo se compararon los aislamientos de *B. thuringiensis* de 35 especies de plantas agrupadas en cuatro categorías: árboles caducifolios, árboles perennes de hoja entera, coníferas y plantas herbáceas (Mizuki *et al.*, 1999). No se observaron diferencias en cuanto al número de aislamientos de *B. thuringiensis* entre los cuatro grupos de plantas. De todas formas concluyeron que se debían seguir haciendo trabajos en este campo.

En el año 2000 se introdujo una nueva técnica para estudiar las poblaciones de *B. thuringiensis*: PCR en células (*in situ*) (Vaid y Bishop, 2000). Sin embargo, concluyeron que la muestra de hoja debía contener al menos 5×10^5 células con el gen a amplificar para que esta técnica funcionara de forma confiable.

Eliot *et al.* (2000) retomaron la hipótesis de Smith y Couche (1991) y la denominaron “la hipótesis guardaespaldas”, que postula que las plantas favorecen la presencia de *B. thuringiensis* en sus hojas para beneficiarse de la capacidad que tiene la bacteria de matar a los insectos defoliadores antes de que consigan poblaciones elevadas.

Entre los años 2002 y 2003 Lee y Ohba publicaron tres artículos (Lee *et al.*, 2002a; Lee *et al.*, 2003; Ohba y Lee, 2003) en los que aislaron *B. thuringiensis* de excrementos de diferentes especies de vertebrados. Observaron que la frecuencia de aislamientos de esta especie bacteriana en excrementos de animales herbívoros era mucho mayor que los encontrados en los excrementos de animales carnívoros, lo que era otra evidencia indirecta de que *B. thuringiensis* está presente en las hojas de las plantas. De todos los aislamientos de *B. thuringiensis* caracterizados algunos resultaron ser tóxicos contra lepidópteros y otros contra dípteros.

Recientemente, Collier *et al.* (2005) estudiaron *B. thuringiensis* en el filoplano de *Rumex obtusifolius* y mostraron que la población de *B. thuringiensis* sigue una distribución normal en las hojas. No obstante, según estos autores debe determinarse si estas distribuciones son el resultado de procesos dinámicos, tales como emigración, inmigración, nacimiento y muerte. Además concluyeron que la unidad mínima de muestreo en estudios de *B. thuringiensis* como especie epífita debe ser la hoja individual.

1.6. Modelos vegetales

La familia *Piperaceae* conforma uno de los clados más basales de las Angiospermas y ciertamente uno de los más especiosos. Este grupo de plantas contiene cerca de 2000 especies y se caracteriza fácilmente por sus inflorescencias en espiga, sus hojas alternas y nudos prominentes. Contiene taxa de interés económico y medicinal, de las cuales las más conocidas son la pimienta negra (*Piper nigrum* L.) y la kava (*Piper methysticum* Fost.) (Cronquist y Takhtajan, 1981; Judd, 1999).

Las piperáceas exhiben una distribución pantropical, donde la mayor concentración de especies se encuentra restringida a los países de la zona andina. En Colombia son muy comunes en las tierras bajas y el piedemonte de las cordilleras (200-3000 m sobre el nivel del mar, msnm), ocupando prácticamente todo tipo de zonas de vida y todos los estados sucesionales (Callejas, 1997; Callejas y Betancur, 1997). La amplia tolerancia a diversos hábitats, la ocurrencia en todo un rango altitudinal y la presencia simultánea de numerosas especies en un solo sitio, ha convertido a esta familia en objetivo favorito de estudios sobre fragmentación, fisiología vegetal, dispersión de semillas, herbivoría, arquitectura arbórea y recambio foliar, en los trópicos (Chiariello *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1989; Chazdon y Kaufmann, 1993; Tinoco-Ojanguren y Percy, 1993). Además, esta familia no posee a nivel regional la incertidumbre nomenclatural y de taxonomía que subyace en la clasificación de tantos grupos de plantas en el neotrópico. Por todo lo anterior, las piperáceas son un grupo ideal para el estudio de *B. thuringiensis* en el filoplano en bosques tropicales.

Por otro lado, en el campo agrícola unos de los cultivos más comunes en Latinoamérica son el maíz (*Zea mays* L.) y el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), por eso se seleccionaron para el estudio de *B. thuringiensis* en ambientes agrícolas. Además, para hacer los estudios de colonización y migración de *B. thuringiensis* se escogió como modelo vegetal el frijol por las siguientes razones: porque en estudios previos ya se había detectado *B. thuringiensis* en hojas de frijol, porque crece rápida y fácilmente, y porque ha sido utilizado como modelo vegetal en otros estudios de bacterias epífitas (Wilson y Lindow, 1992; Wilson *et al.*, 1999; Leveau y Lindow, 2001; Sabaratnam y Beattie, 2003).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la ecología de *B. thuringiensis* en la hoja.

Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de la distribución y caracterización de *B. thuringiensis* en el filoplano de especies de *Piper* (*Piperaceae*) en tres estratos altitudinales.
- Estudio de la diversidad de cepas de *B. thuringiensis* en el filoplano de maíz y fríjol y en sus respectivos suelos en Colombia.
- Determinación de la capacidad de migración de *B. thuringiensis* a hojas de fríjol desde el suelo o desde hojas distantes.
- Determinación de la capacidad de *B. thuringiensis* de colonizar la superficie de las hojas.
- Determinación de la capacidad de *B. thuringiensis* de crecer *in vitro* en medios que simulan el medio ambiente de la hoja.

3. ARTÍCULOS

3.1. Artículo I

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

Distribution and Characterization of *Bacillus thuringiensis* on the Phylloplane of Species of *Piper* (Piperaceae) in Three Altitudinal Levels

P. Maduell,¹ R. Callejas,² K.R. Cabrera,³ G. Armengol,¹ S. Orduz¹

¹ Unidad de Biotecnología y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

² Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia

Received: 21 January 2002; Accepted: 29 April 2002; Online Publication: 28 June 2002

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is found naturally on the phylloplane. In this study 35 samples from 13 species of the genus *Piper* (Piperaceae) were collected from three altitudinal levels located between 1800 and 2900 m above sea level in the Colombian Andean forest of Central Cordillera. Two hundred and fifty-six isolates of *B. thuringiensis* were obtained from 74% of the samples studied. *B. thuringiensis* index (number of isolates of *B. thuringiensis*/number of isolates of sporulated bacilli) was 0.2. The isolates were characterized by crystal morphology, the presence of *cry* genes by PCR, and toxicity against insects. Fifty-five percent of the isolates found presented bipyramidal-crystal morphology, and 42% had round-crystal morphology. Seventy percent of the isolates amplified *cry1* [*cry* one] genes (generally toxic to lepidopterans); 41.4% amplified *cry4* and/or *cry11* [*cry* eleven] genes (generally toxic to dipterans), and none of the isolates amplified *cry3* genes (generally toxic to coleopterans). The most abundant genotype of *cry* genes (54.7% of the total) was *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, and *cry1B*. From the total isolates found, 7.8% presented both *cry1* and *cry11* genes, and five isolates (2.0%) harbored *cry1*, *cry4*, and *cry11* genes; all these isolates were toxic to *Culex quinquefasciatus* (Diptera) but not to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). To our knowledge, these genotypes have not been previously reported. Overall, almost 60% of the isolates were toxic to *S. frugiperda*, and a little more than 40% of the isolates were toxic to *C. quinquefasciatus*. The populations of viable vegetative cells and spores per unit area were estimated and studied statistically. No significant differences in the number of *B. thuringiensis* isolates per cm² of leaf among the three altitudinal levels were found, nor were they found among the different *Piper* species evaluated. This study increases the knowledge of the ecology of *B. thuringiensis*.

Introduction

Bacillus thuringiensis is a spore-forming Gram-positive bacterium. It has a particular characteristic that differentiates this species from others of the *Bacillus* group II (characterized by ellipsoidal spores that do not swell the mother cell): the formation of a proteic crystal at sporulation [36]; some of the proteins are toxic for a large number of insects. This characteristic has made *B. thuringiensis* the most studied and utilized bacterium in the biological control of pests in agriculture, forestry, and disease vectors [35, 42].

From an ecological point of view, the natural habitat of *B. thuringiensis* is not known exactly. Historically, it has been found in soil, sick or dead insects, and stored products, such as tobacco, flour, and grain [2, 3, 12, 17–20, 22, 27, 28], although it has also been detected in dust particles in suspension, on plant leaves, in food, animal skin, and even in marine sediments [1, 2, 14, 26, 29, 39, 40].

There are very few articles in the scientific literature describing the ecological niche of *B. thuringiensis* and the role that this bacterium plays in the natural environment. Martin and Travers [28], who collected *B. thuringiensis* from soils around the world, concluded that the role of *B. thuringiensis* in the environment was an enigma. In 1991, Smith and Couche [40] published the first study on the search for *B. thuringiensis* on leaves of vascular plants, and they isolated *B. thuringiensis* from 50 to 70% of the leaves sampled. In their conclusions, they suggested that the role of *B. thuringiensis* in the environment should be reconsidered. Afterward, Ohba [32] and Damgaard et al. [15] concluded that the origin of *B. thuringiensis* populations on leaves was not due solely to *B. thuringiensis* populations in the soil where these plants grew. Since then, studies on the search for *B. thuringiensis* on plant leaves have continued. The researchers have tried to understand in depth the role of this organism in this habitat [16, 23, 30, 37].

The Piperaceae family (black pepper family) forms one of the most basal clades of the angiosperms and certainly it is the one that contains the most species. This group of plants contains approximately 2000 species and is easily characterized by its spicate inflorescence, its alternate leaves, and its prominent knots. Ninety percent of the species known are grouped in two genera: *Piper* and *Peperomia* [6, 13, 21].

The Piperaceae exhibit a pan-tropical distribution in which the largest concentration of species is restricted to

the Andean regions of South America. In Colombia, they are very common in lowlands and at the base of mountain ranges, normally occurring between 100 and 2500 meters above sea level (masl), occupying practically all kinds of life zones and all the succession stages [4, 5]. The wide tolerance of diverse habitats, the occurrence in a large altitudinal range, and the simultaneous presence of numerous species in a particular site have made this family a favorite subject of study on fragmentation, plant physiology, seed dispersion, arboreal architecture, and foliar change in the tropics [10, 11, 45, 47]. Also, this family does not suffer the uncertainty of nomenclature and taxonomy at a regional level that underlies the classification of so many groups of plants in the neo-tropics. For all of the above reasons, the Piperaceae is an ideal group for the study of *B. thuringiensis* on the phylloplane.

In this study, the distribution of varieties of *B. thuringiensis* on the phylloplane of different species of the Piperaceae family, at an altitudinal range from 1800 to 2900 masl, is described in order to answer some of the questions that exist around the ecology of this bacterium.

Methods

Sample Collection, Transportation, and Processing

During the morning hours of three days [10/09/1999, 04/02/2000, and 26/05/2000 (dd/mm/yyyy)], leaves from 35 plants belonging to 13 species of the Piperaceae family were collected (*Piper aduncum* L., *P. artanthe* C. DC., *P. calcerolarium* C. DC., *P. crassinervium* H. B. K., *P. daniel-gonzalezii* Trel., *P. glanduligerun* C. DC., *P. holtonii* C. DC., *P. imperiale* C. DC., *P. marequitense* H. B. K., *P. montanum* C. DC., *P. otophorum* C. DC., *P. scobinifolium* Yun., and *P. sphaeroides* C. DC.). Collections at different times of the year are supposed not to be critical at equatorial latitudes. All leaves were taken from at least 30 cm from the ground level. Vouchers for each species were collected and deposited in the University of Antioquia herbarium (HUA), under R. Callejas numbering.

The sampling was carried out in the Santa Rosa de Osos high plateau, in the jurisdiction of the municipalities of Bello, San Pedro, and Medellín, located on the Colombian Central Cordillera between 1800 and 2900 masl and approximately at the coordinates 6° 21' 30" N, 75° 38' 30" W. The sampled zone includes areas of pre-mountainous rain forest and pre-mountainous very wet rain forest, with average annual precipitations between 1000 (the lowest parts) and 4000 (the highest parts) mm, and with average annual temperatures between 16 and 24°C. This zone was divided into three altitudinal levels: low (1800–1950 masl), medium (1960–2300 masl), and high (2310–2900 masl). In Table 1 the distribution of the samples collected in the three levels is shown. Samples were taken from all three altitudes at each sampling time.

Table 1. Distribution and number of leaf samples in relation to the *Piper* species and the altitude where they were collected in the Andean Colombian Central Cordillera (masl, meters above sea level)

Species	Altitudinal levels		
	Low (1800–1950 masl)	Medium (1960–2300 masl)	High (2310–2900 masl)
<i>P. aduncum</i>		1	
<i>P. artanthe</i>			3
<i>P. calcerolarium</i>	2	3	1
<i>P. crassinervium</i>	2	2	1
<i>P. daniel-gonzalezii</i>	1	1	1
<i>P. glanduligerun</i>	3	1	
<i>P. holtonii</i>		1	
<i>P. imperiale</i>	1		
<i>P. marequitense</i>		1	
<i>P. montanum</i>		1	2
<i>P. otophorum</i>	1		
<i>P. scobinifolium</i>		1	1
<i>P. sphaeroides</i>	2	1	1
Total	12	13	10

From each plant a minimum of four leaves were collected (depending on the leaf size of each species). We selected healthy leaves (no sign of damage), at their maximum physiological development, not contaminated with soil, and not affected by direct sunlight. Each leaf sample was placed in a hermetically sealed, sterile plastic bag. Leaves were transported at 4°C to the laboratory, where they were cut under aseptic conditions into square sections of approximately 0.5 to 1 cm² until a total area of 120 cm² per sample was obtained. The samples were then stored in 15 mL of liquid B (LB) medium [33] with 20% glycerol at –20°C until they were analysed.

B. thuringiensis Isolation

The technique described by Smith and Couche [40] was used with the following modifications. The tubes with the samples were defrosted, then shaken in a vortex for 1 min, and the liquid was recovered. It was centrifuged for 15 min at 5000 rpm, and the pellet was resuspended in 1 mL of sterile distilled water. It was centrifuged again for 5 min at 12,500 rpm and the pellet was resuspended in 200 µL of sterile water. Serial dilutions of this suspension were made and spread plated on petri dishes of LB culture medium. It is believed that the sample treatment and storage did not kill any vegetative cells or cause any spores to germinate before they reached the agar surface. After 48 h the petri dishes were observed and the colonies that had a *B. thuringiensis*-like morphology were selected. *B. thuringiensis* colonies have a dull or frosted glass appearance and often an undulate margin from which extensive outgrowths do not develop [41]. Colonies were incubated in M1 liquid-sporulation medium [34] and observed 24 h later under phase-contrast microscopy. That suspension of crystals and spores was designated final whole culture (FWC). Those isolates that had parasporal crystals were identified as *B. thuringiensis* and stored at –20°C for further

analysis, while the others (most of them sporulated bacilli) were rejected. The *B. thuringiensis* index was calculated for each sample as the number of isolates of *B. thuringiensis*/number of isolates of sporulated bacilli. The original population of spores and/or viable cells per unit of leaf area was also estimated from the colony-forming units (CFU) of the two highest dilutions in which *B. thuringiensis* had been isolated.

The following serovars of *B. thuringiensis* were grown: *kurstaki*, *aizawai*, *israelensis*, *medellin*, *morrisoni* pathovar. *tenebrionis*, *darmstadiensis*, *galleriae*, and *tolworthi* HD125. All were obtained from the collection of microorganisms of the Biotechnology and Biological Control Unit of the Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, to be used as controls during isolate characterization.

DNA Extraction and PCR Analysis

All isolates were plated on petri dishes of LB medium. After 18 h, a loop full of cells was collected and resuspended in 200 µL of sterile water. The cellular suspensions were kept at –20°C for 2 h and then immediately placed in a 100°C bath for 10 min, centrifuged for 45 s at 12,500 rpm, and the supernatants containing total DNA were recovered. The DNA was then stored at –20°C for further analysis.

General primers *gral-cry1*, *Col*, *Dip*, and *gral-cry11* [3, 7] were used to detect the presence of *cry1*, *cry3*, *cry4*, and *cry11* genes, respectively. The primer groups CJ1-7, CJ8-13, and CJ14-19 [8, 9] were also used to detect the presence of the specific *cry1* genes (*cry1Aa*, *b*, *c*, *d*; *cry1B*, *C*, *D*; and *cry1E*, *F*, *cry9A*, respectively). The PCR mixtures contained PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.8), 2.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 0.2–0.4 µM of each primer, 0.5–2 µL *Taq* polymerase, and 1–2.5 µL of DNA; the volume was completed to 25 µL with sterile H₂O. The amplification conditions were the following: a denaturation step

for 5 min at 94°C, 35 cycles (for the general primers) or 40 cycles (for the specific primers): denaturation 45 s at 94°C, annealing 45 s at 49°C (for *gral-cry1*, and CJ14-19), 46°C (Col), 52°C (Dip), 45°C (*gral-cry11*), or 48°C (CJ1-7 and CJ8-13), and a 1 min extension at 72°C; finally, an extra extension step of 6–10 min was carried out at 72°C. After the amplification, DNA fragments were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel (for the general primers) or in a 2% agarose gel (for the specific primers) at 100 V for 45 min (general and CJ14-19 primers) or 70 min (CJ1-7 and CJ8-13 primers). *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* and *B. thuringiensis* serovar. *aizawai* (for *gral-cry1*, CJ1-7 and CJ8-13), *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* pathovar. *tenebrionis* (for Col), *B. thuringiensis* serovar. *israelensis 1884* (for Dip), *B. thuringiensis* serovar. *israelensis 1884* and *B. thuringiensis* serovar. *medellin* (for *gral-cry11*), and *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*, *B. thuringiensis* serovar. *galleriae*, and *B. thuringiensis* serovar. *tolworthi* HD125 (for CJ14-19) were used as positive controls.

Bioassays

The toxicity of all *B. thuringiensis* isolates was bioassayed with first-instar *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera, Noctuidae). Four hundred μL of the FWC was spread on the surface of artificial bean-based diet [38] in plastic cups (3 cm diameter). These were allowed to air dry, and five *S. frugiperda* neonatal larvae were added. Bioassay cups were placed at 30°C, and the mortality was observed 72 h later. The range of toxicity of *B. thuringiensis* isolates that were toxic was calculated by using FWC serial dilutions (10^0 – 10^{-5}) by duplicate. *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* and *B. thuringiensis* serovar. *aizawai* were used as positive controls. All the isolates were also bioassayed with third-instar *Culex quinquefasciatus* larvae (Diptera, Culicidae). One hundred μL of FWC was added to 100 mL of water in plastic cups, with 10 larvae of *C. quinquefasciatus*, and they were placed at 30°C. The mortality of the larvae was assessed 24 h later. The range of toxicity of the isolates was also calculated using FWC serial dilutions (10^0 – 10^{-5}) by duplicate, *B. thuringiensis* serovar. *israelensis 1884* was used as a positive control. In both bioassays, an isolate was considered to be toxic if all the larvae were dead.

Statistical Analysis

An initial analysis was carried out to evaluate the differences between the numbers of isolates of *B. thuringiensis* among the three altitudinal levels and the different species of *Piper*. In this study, each one of the leaf samples was defined as the experimental unit and the number of viable *B. thuringiensis* cells and/or spores per cm^2 of leaf was taken as the dependent variable.

In a second analysis, the aim was to observe if there were any differences regarding the characteristics of the *B. thuringiensis* isolates found in the three altitudinal levels and in the different vegetal species. This analysis was carried out in two phases. In the first, each one of the vegetal samples was considered as the experimental unit; in second, each one of the *B. thuringiensis*

isolates was considered as the experimental unit. In both phases, the numbers of viable *B. thuringiensis* cells and/or spores that had round crystal, bipyramidal crystal, toxicity for *S. frugiperda*, toxicity for *C. quinquefasciatus*, presence of *cry1* genes, presence of *cry4* genes, and presence of *cry11* genes were taken as the dependent variables. In the first phase of this analysis, the value of the variables was the percentage of viable cells that presented a given characteristic in each vegetal sample; in the second phase, absolute values of the dependent variables were used. The independent variables utilized in the two phases were the same as in the first analysis. The results obtained were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) for each variable, with the Statistica 5.0 program (StatSoft, Inc.).

Results

Distribution of *B. thuringiensis*

B. thuringiensis isolates were found from 26 out of the 35 plants studied (74.3%). Altogether, 1269 isolates were studied, of which 256 were characterized as *B. thuringiensis* (*B. thuringiensis* index of 0.2). The highest number of *B. thuringiensis* isolates was found from leaves from *P. calcerolarium* located at a medium altitude (2110 masl) with a total of 44 isolates, and with a *B. thuringiensis* index of 0.8. Five samples were found with a *B. thuringiensis* index equal to 1 (i.e., all the isolates were *B. thuringiensis*) in *P. artanthe*, *P. crassinervium* (2 samples), *P. glanduligerun*, and *P. imperiale*. The distribution of *B. thuringiensis* isolates at different altitudes and in *Piper* species are shown in Tables 2 and 3. *B. thuringiensis* was found at each altitudinal level and on all the vegetal species (except one).

B. thuringiensis Characterization

The characteristics of *B. thuringiensis* isolates obtained from the samples of the *Piper* species at the different altitudes can be observed in Tables 4 and 5. Of the 256 *B. thuringiensis* isolates, 140 (54.7%) had bipyramidal crystals, 108 (42.2%) round crystals, 3 (1.2%) amorphous crystals, and 5 (2.0%) polymorphic crystals, composed of a mixture of round and bipyramidal crystals.

Only 7 isolates (2.7%) amplified *cry4* genes in the PCR tests. No isolates amplified *cry3* genes, whereas 99 isolates (38.7%) amplified *cry11* genes. With regard to the amplification with the *gral-cry1* primers, 149 isolates exhibited an amplification product equivalent to the positive controls and 31 isolates exhibited a low-intensity amplification product, which were also considered as positive;

Table 2. Distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates from several *Piper* species in three altitudinal levels of the Andean Colombian Central Cordillera

Altitudinal levels	Plants with <i>B. thuringiensis</i> /total (%)	<i>B. thuringiensis</i> isolates/sporulated bacilli (Bt index)	<i>B. thuringiensis</i> isolates per plant (SD)	Estimated population of <i>B. thuringiensis</i> per cm ² (SD) ^a
Low	7/12 (58.3)	90/197 (0.45)	7.5 (10.5)	1940 (3232)
Medium	11/13 (84.6)	136/941 (0.14)	10.5 (13.1)	5422 (16522)
High	8/10 (80)	30/131 (0.23)	3 (4.1)	1204 (3176)
Total	26/35 (74.3)	256/1269 (0.2)	7.3 (10.5)	3023 (10295)

^a Estimation of the population of spores and/or viable cells per area unit, calculated from the CFU of the two highest dilutions positive for *B. thuringiensis*.

therefore, 180 isolates (70.3%) amplified *cry1* genes. From the 180 isolates that amplified with the *gral-cry1* primers, 155 isolates (86.1%) amplified *cry1A* genes, 148 isolates (82.2%) amplified *cry1B* genes, 5 isolates (2.8%) amplified *cry1D* genes, whereas *cry1C*, *cry1E*, *cry1F*, or *cry9A* genes were not found in the population studied. Also, 20 isolates (7.8%) did not amplify any of the above *cry1* genes. Finally, two isolates were found that did not amplify any of the evaluated genes (*cry1*, *cry3*, *cry4*, *cry9*, and *cry11*), though they killed *S. frugiperda* at low dilutions (10⁻²).

The set of *cry* genes within an individual *B. thuringiensis* isolate is referred to as its *cry* genotype. The *cry* genotypic frequencies of the *B. thuringiensis* isolates found on the phylloplane of individuals belonging to the genus *Piper* are described in Table 6. The number of *cry* genes present in the *B. thuringiensis* isolates found in this study varied between one and five. Overall, 15 combinations of *cry* genes (genotypes) were found, and more than one *cry* genotype was found in 10 out of the 26 *B. thuringiensis*-

positive leaf samples (38%). Some phylloplane samples contained *B. thuringiensis* isolates displaying as many as six different *cry* genotypes, although other leaf samples contained isolates with one to four *cry* genotypes.

One hundred and fifty *B. thuringiensis* isolates were toxic to *S. frugiperda*, which represent 58.6% of the population found. Five of these presented toxicity similar to that of *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*, widely used in commercial products. On the other hand, it was observed that 104 isolates (41.0%) were toxic to third-instar *C. quinquefasciatus* larvae, 11 of which exhibited toxicity equal to or higher than that of *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. One isolate was toxic against the two species evaluated and two isolates were not toxic in either *S. frugiperda* or *C. quinquefasciatus*.

Very high percentage relations were observed among toxicity, crystal morphology, and presence of *cry* genes. One hundred percent of the isolates that were toxic to the *S. frugiperda* larvae had a *cry1* gene, and 94.2% of the

Table 3. Distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates on different *Piper* species sampled in the Andean Colombian Central Cordillera

Species	Plants with <i>B. thuringiensis</i> /total (%)	<i>B. thuringiensis</i> isolates/sporulated bacilli (Bt index)	<i>B. thuringiensis</i> isolates per plant (SD)	Estimated population of <i>B. thuringiensis</i> per cm ² (SD) ^a
<i>P. aduncum</i>	1/1 (100)	2/6 (0.33)	2 (–) ^b	0.06 (–)
<i>P. artanthe</i>	2/3 (66.6)	2/70 (0.03)	0.66 (0.6)	0.02 (0.02)
<i>P. calcerolarium</i>	4/6 (66.6)	60/125 (0.48)	10 (17.2)	624 (1490)
<i>P. crassinervium</i>	4/5 (80)	51/61 (0.83)	10.2 (14.3)	1073 (2289)
<i>P. daniel-gonzalezii</i>	3/3 (100)	36/270 (0.13)	10.6 (11.9)	3476 (5665)
<i>P. glanduligerum</i>	2/4 (50)	29/320 (0.09)	7.25 (9.5)	2294 (3788)
<i>P. holtonii</i>	1/1 (100)	1/7 (0.14)	1 (–)	0.03 (–)
<i>P. imperiale</i>	1/1 (100)	7/7 (1.0)	7 (–)	216 (–)
<i>P. marequitense</i>	1/1 (100)	18/154 (0.11)	18 (–)	60000 (–)
<i>P. montanum</i>	2/3 (66.6)	3/6 (0.5)	1 (1)	668 (940)
<i>P. otophorum</i>	0/1 (0)	0/3 (0.0)	0 (–)	0 (–)
<i>P. scobinifolium</i>	2/2 (100)	12/128 (0.09)	6 (7)	1.8 (2.5)
<i>P. sphaeroides</i>	3/4 (75)	39/112 (0.35)	9.75 (8.4)	4458 (4351)
Total	26/35 (74.3)	256/1269 (0.2)	7.3 (10.5)	3023 (10294)

^a Estimation of the population of spores and/or viable cells per area unit, calculated from the CFU of the two highest dilutions positive for *B. thuringiensis*.

^b The species with only one sample do not have SD.

Table 4. Characterization (in percentage) of *Bacillus thuringiensis* isolates according to the altitudinal levels, by means of crystal morphology, presence of *cry* genes, and toxicity to *S. frugiperda* and *C. quinquefasciatus* larvae

Altitudinal levels	Crystal morphology (%)			Genotype ^a (%)			Toxicity (%)	
	Bipyramidal	Round	Other	<i>cry1</i>	<i>cry4</i>	<i>cry11</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>
Low	77	17	7	97	0	3	93	6
Medium	38	63	0	48	0	63	34	66
High	67	33	0	87	26	33	67	33
Total	55	42	3	70	3	38	58	41

^a No isolates amplified neither gene *cry3* nor *cry9*.

isolates that were toxic to *C. quinquefasciatus* amplified *cry4* and/or *cry11* genes. On the other hand, 99.3% of the isolates with bipyramidal crystals amplified *cry1* genes and 91.6% of the isolates that had round crystal amplified *cry4* and/or *cry11* genes; 93.3% of the isolates that were toxic to the *S. frugiperda* larvae had bipyramidal crystals, and 100% of the isolates that killed *C. quinquefasciatus* had round crystals.

Statistical Analysis

No statistically significant differences were found in the number of viable *B. thuringiensis* cells and/or spores per cm² among the three altitudinal levels, or among the different vegetal species (data not shown).

With regard to the analysis of the *B. thuringiensis* characteristics (round crystal, bipyramidal crystal, toxicity for *S. frugiperda*, toxicity for *C. quinquefasciatus*, presence of *cry1*, *cry4*, and *cry11* genes), measured as the percentage

of isolates with those features per vegetal sample, no significant differences were found between the *Piper* species, yet significant differences were found between the altitudinal levels. It was found that the number of isolates with a round crystal morphology and the number of isolates toxic to *C. quinquefasciatus* were significantly higher in the medium level ($p = 0.02$ in both cases) (data not shown).

In the second analysis of this study, differences among the characteristics of the isolates, measured in absolute value, were sought. No significant differences were found among the altitudinal levels, or among the vegetal species for the variables evaluated (data not shown).

Discussion

As in studies in the United States, Japan, Denmark, Indonesia, and India [15, 16, 23, 30, 32, 37, 40], *B. thuringiensis* was isolated from plant leaves in Colombia. In this

Table 5. Characterization (in percentage) of *Bacillus thuringiensis* isolates according to the *Piper* species, by means of crystal morphology, presence of *cry* genes, and toxicity to *S. frugiperda* and *C. quinquefasciatus* larvae

Species	Crystal morphology (%)			Genotype ^a (%)			Toxicity (%)	
	Bipyramidal	Round	Other	<i>cry1</i>	<i>cry4</i>	<i>cry11</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>P. aduncum</i>	0	0	100	100	0	0	100	0
<i>P. artanthe</i>	0	100	0	0	50	100	0	100
<i>P. calcerolarium</i>	75	25	0	93	0	23	75	25
<i>P. crassinervium</i>	92	8	0	98	0	0	94	8
<i>P. daniel-gonzalezii</i>	12	88	0	22	0	84	12	88
<i>P. glanduligerun</i>	31	69	0	45	0	69	31	69
<i>P. holtonii</i>	0	100	0	100	0	0	0	0
<i>P. imperiale</i>	100	0	0	100	0	0	100	0
<i>P. marequitense</i>	0	100	0	17	0	100	0	100
<i>P. montanum</i>	100	0	0	100	0	0	100	0
<i>P. otophorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. scobinifolium</i>	8	92	0	8	0	92	8	92
<i>P. sphaeroides</i>	41	44	15	92	18	18	80	18
Total	55	42	3	70	3	38	58	41

^a No isolates amplified neither gene *cry3* nor *cry9*.

Table 6. Genotypic frequencies of *Bacillus thuringiensis* isolates from several *Piper* species

Number of isolates	Genotype	Percentage
140	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1B</i>	54.7
73	<i>cry11</i>	28.5
13	<i>cry1</i> (specific not recognized), ^a <i>cry11</i>	5.1
5	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry1B, cry1D</i>	2.0
5	<i>cry1</i> (specific not recognized) ^a	2.0
3	<i>cry1Aa, cry11</i>	1.2
2	<i>cry1Ad, cry4, cry11</i>	0.8
2	<i>cry1</i> (specific not recognized), ^a <i>cry4, cry11</i>	0.8
2	<i>cry4, cry11</i>	0.8
2	<i>cry1Aa, cry1Ad, cry11</i>	0.8
2	<i>cry1Ad, cry11</i>	0.8
2	<i>cry1Aa, cry1B</i>	0.8
1	<i>cry1Aa, cry1Ad</i>	0.4
1	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad</i>	0.4
1	<i>cry1Aa, cry1Ad, cry4, cry11</i>	0.4
2	No amplification of any gene	0.8

^a Samples that were positive for *gral-cry1* primers and negative for CJ1-7, CJ8-13, and CJ14-19 primers.

study, *B. thuringiensis* was isolated in 74% of the samples evaluated, which confirms the conclusion from previous studies in which it was observed that *B. thuringiensis* is a bacterium naturally occurring in the phylloplane [40, 46, Damgaard PH PhD thesis]. The presence of *B. thuringiensis* in such a high percentage of samples, compared with other reports [15, 30, 32], could be due to the absence of seasons in the tropics, which avoids frequent prolonged changes of environmental conditions and, therefore, favors the stability of the bacterial micro biota. The *B. thuringiensis* index found in this study (0.2) was also greater than the indexes obtained in other studies in which *B. thuringiensis* was isolated from phylloplane [15, 30, 32], but was very similar to what Jara et al. [MSc thesis] found in a study searching for *B. thuringiensis* in leaves of crops grown in Colombia; in that study a *B. thuringiensis* index of 0.25 was found.

The most abundant genotype of *cry* genes (54.7% of the total) was *cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, and cry1B*. Twenty isolates were positive in the PCR with *gral-cry1* primers, but negative with all specific primers for *cry1* genes. It is probable that these isolates have another *cry1* gene (*cry1G, cry1H, cry1I, cry1J, or cry1K*) undetected with the specific CJ primers, or some could have new *cry1* genes. Moreover, 20 isolates (7.8%) had both *cry1* and *cry11* genes, and five isolates (2.0%) had *cry1, cry4, and cry11* genes; all these isolates were toxic to *C. quinque-*

fasciatus but not to *S. frugiperda*. To our knowledge, these genotypes have not been previously reported. Therefore, these strains might be good candidates in the search for biocontrol agents with a wider spectrum of action, since they could present dual activity against dipteran and lepidopteran (other than the species tested here) insects.

When the *cry* genotype composition of the *B. thuringiensis* isolates was analyzed, it was found that some phylloplane samples contained *B. thuringiensis* isolates with less than three *cry* genes and some other bacterial isolates with more complex *cry* genotypes containing four or five *cry* genes; in most of these cases, the complex *cry* genotypes were a combination of the simpler *cry* genotypes. It has been shown that plasmid transfer can occur between different strains of *B. thuringiensis* in natural environments, such as soil, insects and water [43, 44]; moreover, gene transfer has been demonstrated between different strains of *Pseudomonas putida* on the phylloplane [31]. It would not be surprising if the more complex *B. thuringiensis cry* genotypes found in the present study were the result of a conjugation process of bacterial cells containing simpler *cry* genotypes. If this were correct, it would confirm that *B. thuringiensis* could be found as a vegetative cell on the leaf, capable of exchanging genetic material.

The presence of *cry1* genes was associated with bipolar crystal morphology and toxicity in the lepidopteran *S. frugiperda*, whereas *cry4* and/or *cry11* genes were associated with round morphology and toxicity in the mosquito *C. quinquefasciatus*. This relationship agrees with the conclusion of Carozzi et al. [7] and Lereclus et al. [25] that the type of *cry* genes might determine the form of the crystal and its toxicity, but contrasts with the later reports of Ohba [32] and Kim [24].

The large proportion of *B. thuringiensis* isolates obtained in this study that were toxic (99%), contrasts with the results reported by others. Ohba [32] showed that 90% of the 186 *B. thuringiensis* isolates found were not toxic against *Bombyx mori* or against *Aedes aegypti*; Mizuki et al. [30] found that 76% of 120 isolates were not toxic against *C. pipiens, Anopheles stephensi, or Plutella xylostella*; furthermore, Bernhard et al. [2] showed that 48.8% of the 5000 *B. thuringiensis* isolates obtained from samples collected worldwide were not toxic to a wide range of insects. It is probable that these discrepancies are due to the different insect species used in the bioassays, or to a difference in the distribution of *B. thuringiensis* genotypes, and, in this later case, that would be explained by the higher biological diversity of the tropics.

In the present study, an approximation to the numerical population of *B. thuringiensis* (vegetative cells and/or viable spores) per cm² of leaf was attempted. This population per unit area has been estimated from the dilution that has been necessary to obtain those isolates, and gives a much better population estimate than the mere number of bacteria found in samples. Values between 2 and 5×10^3 viable *B. thuringiensis* cells per cm² of leaves were obtained. These values contrast with values between 3 and 1×10^2 per cm² found by Smith and Couche [40], and with those of Jara [MSc thesis], who found between 1 and 30 spores per cm². It is very probable that these differences of one order of magnitude could be due to the use of heat shock in their isolation procedures to eliminate non-spore-forming microorganisms. This comparison could lead to the conclusion that the major part of the viable cells of *B. thuringiensis* on leaves are in vegetative form. However, it is necessary to say that the conclusion has been obtained by comparing two different studies with different vegetal species; therefore, further studies are needed to shed light on this subject.

B. thuringiensis was found in all the altitudinal levels, and in all but one of the species evaluated. In the statistical study, it was observed that the number of *B. thuringiensis* did not differ in an altitudinal range between 1800 and 2900 masl, and none of the plant species sampled bore a greater number of isolates than the others. Regarding the characteristics of the *B. thuringiensis* isolates found, no statistically significant differences were observed among the different vegetal species samples, but differences among the altitudinal levels were found. The isolates with round crystals and the isolates toxic to *C. quinquefasciatus* were more abundant in the medium level than in the other two. It would be necessary to carry out a detailed study of the population of dipterans in that altitudinal range to see if there is some relationship between the insects of this order and the plant species at this altitude or an unknown factor that could select such a type of strains. In a published analysis [19], a greater number of isolates of *B. thuringiensis* were found in the indoor environment of warehouses in the mountainous areas than in lower zones. From the absolute data shown in that study, it is difficult to conclude whether altitude had some effect on *B. thuringiensis* distribution because the actual numbers, of bacteria in the samples studied could not be estimated.

B. thuringiensis has a distribution that includes various habitats. It is possible that the *B. thuringiensis* spores pass to the plant leaves by means of the wind or by direct contact with the soil during plant germination. On the

leaves, *B. thuringiensis* can live as a spore and/or vegetative cell, where the populations of different strains grow and accommodate themselves in a different way than in the soil [Damgaard PH PhD thesis]. It is at this time that they can be ingested by some phytophagous insect. Later, the leaf and/or the insect falls to the soil or water, where a reservoir of strains can be maintained, and the cycle can be reinitiated in the soil. There should be some factors that favor the development of specific *B. thuringiensis* serovars on the leaves, although up to this time, no differences have been found in the number of *B. thuringiensis* isolates among the different vegetal species [30, 40].

According to Damgaard [PhD thesis], leaves could act as a reservoir of *B. thuringiensis* strains toxic against species of defoliating insects (e.g., *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*). The facts that the *kurstaki* serovar is one of the most frequently found on leaves [15, 30, 32], that the pattern of the crystal protein found the most among *B. thuringiensis* leaf isolates is similar to that of *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* [40], and that in the present study the most frequent *cry* genes are *cry1* (present in serovars toxic to lepidopterans, although not exclusively) add weight to that theory. One of the main orders of defoliators is, without a doubt, the Lepidoptera, and it is precisely this order that is most susceptible to the Cry1 toxins. What is still far from being proved is whether plants maintain a mutual relationship with *B. thuringiensis* to fight against the insect species that feed on them, as Smith and Couche [40] proposed. For this reason, it is of enormous interest to continue studying the ecology of this microorganism in order to elucidate its behavior, habitats, and interactions with other organisms.

In summary, isolation, enumeration, and genotypic and toxicological characterization of *B. thuringiensis* from 13 species within the genus *Piper*, collected at three different altitudes in the Colombian Andean forest, were performed. *B. thuringiensis* was confirmed to naturally occur in plant phyllospheres. No altitudinal or species-specific distribution was found. Moreover, characterization of the isolates revealed many different genotypes, including some rare and some not previously reported.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Dennis Burges for critical review of the manuscript. This study has been carried out with the financial support of COLCIENCIAS contract 4501-07-532-97, the Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB),

and a postgraduate scholarship awarded by Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) (P.M.).

References

- Akhurst RJ, Lyness EW, Zhang QY, Cooper DJ, Pinnock DE (1997) A 16S rRNA gene oligonucleotide probe for identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from sheep fleece. *J Invertebr Pathol* 69:24–31
- Bernhard K, Jarrett P, Medadows M, Butt J, Ellis DJ, Roberts GM, Pauli S, Rodgers P, Burges HD (1997) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol* 70:59–68
- Bravo A, Sarabia S, López L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Nuñez-Valdez M, Soberón M, Quintero R (1998) Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64:4965–4972
- Callejas R, Betancur J (1997) Nuevas especies de Piperaceas de los Andes de Colombia. *Novon* 6:210–219
- Callejas R (1997) Piperaceae. In: JC Mutis (ed) *Flora de la Expedición Botánica*, Vol 13, Casa de la Cultura de España. Madrid
- Candolle C (1923) *Piperacearum clavis analytica*. *Candollea* 1:66–415
- Carozzi NB, Kramer VC, Warren GW, Evola S, Koziel MG (1991) Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl Environ Microbiol* 57:3057–3061
- Ceron J, Covarrubias L, Quintero R, Ortiz A, Ortiz M, Aranda E, Lina L, Bravo A (1994) PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 60:353–356
- Ceron J, Ortiz A, Quintero R, Güereca L, Bravo A (1995) Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 61:3826–3831
- Chazdon RL, Kaufmann S (1993) Plasticity of leaf anatomy in relation to photosynthesis light acclimation. *Funct Ecol* 7:385–394
- Chiariello NR, Field CB, Mooney HA (1987) Midday wilting in a tropical pioneer tree. *Funct Ecol* 1:3–11
- Chilcott CN, Wigley PJ (1993) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soils and habitats in New Zealand. *J Invertebr Pathol* 61:244–247
- Cronquist A (1981) *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York
- Damgaard PH (1996) Enterotoxins-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett Appl Microbiol* 23:145–150
- Damgaard PH, Hansen BM, Pedersen JC, Eilenberg J (1997) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *J Appl Microbiol* 82:253–258
- Damgaard PH, Abdel-Hameed A, Eilenberg J, Smits PH (1998) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on grass foliage. *W J Microbiol Biotechnol* 14:239–242
- Hastowo S, Lay BW, Ohba M (1992) Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *J Appl Bacteriol* 73:108–113
- Helgason E, Caugant DA, Olsen I, Lecadet M-M, Chen Y, Mahillon J, Lövgren A, Hegna I, Kavaløy K, Kolstø A-B (1998) Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr Microbiol* 37:80–87
- Hongyu Z, Ziniu Y, Wangxi D (2000) Composition and ecological distribution of *Cry* proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. *J Invertebr Pathol* 76:191–197
- Iriarte J, Bel Y, Ferrandis MD, Andrew R, Murillo J, Ferrer J, Caballero P (1998) Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *System Appl Microbiol* 21:97–106
- Judd WS, Campbell ChS, Kellog EA, Stevens PF (1999) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Assoc, Sunderland, MA
- Kaelin P, Morel P, Gadani F (1994) Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricornis* (F). *Appl Environ Microbiol* 60:19–25
- Kaur S, Singh A (2000) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* in leguminous phylloplane in the New Delhi region of India. *W J Microbiol Biotechnol* 16:679–682
- Kim HS (2000) Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. *Curr Microbiol* 41:250–256
- Lereclus D, Delécluse A, Lecadet M-M (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: P Entwistle, JS Cory, MJ Bailey, A Higgs (eds) *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley and Sons, London, pp 37–69
- Maeda M, Mizuki E, Nakamura Y, Hatano T, Ohba M (2000) Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Curr Microbiol* 40:418–422
- Marquez AM, Diaz JMCS, Ribeiro BM (2000) Screening and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Brazil for the presence of coleoptera-specific *cry* genes. *Microbiol Res* 154:355–362
- Martin PAW, Travers RS (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 55:2437–2442
- Meadows MP, Ellis DJ, Butt J, Jarrett P, Burges HD (1992) Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl Environ Microbiol* 58:1344–1350
- Mizuki E, Ichimatsu T, Hwang S-H, Park YS, Saitoh H, Higuchi K, Ohba M (1999) Ubiquity of *Bacillus thuringiensis* on phylloplanes of arboreous and herbaceous plants in Japan. *J Appl Microbiol* 86:979–984

31. Normander B, Christensen BB, Molin S, Kroer N (1998) Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Environ Microbiol* 64:1902–1909
32. Ohba M (1996) *Bacillus thuringiensis* population naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *J Appl Bacteriol* 80:56–64
33. Orduz S, Rojas W, Correa MM, Montoya AE, De Barjac H (1992) A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J Invertebr Pathol* 59:99–103
34. Orduz S, Diaz T, Restrepo N, Patiño MM, Tamayo MC (1996) Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp *medellin*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:231–237
35. Priest FG (1989) Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria In: CR Harwood (ed) *Biotechnology Handbooks 2 Bacillus*. Plenum Press, New York, pp 27–56
36. Priest FG (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*. In: AL, Sonenshein JA, Hoch R Losik (eds) *Bacillus subtilis and other Gram-Positive Bacteria*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp 3–16
37. Rizali A, Asano S, Sahara K, Bando H, Lay BW, Hastowo S, Iizuka T (1998) Novel *Bacillus thuringiensis* serovar. *aizawai* strains isolated from mulberry leaves in Indonesia. *Appl Entomol Zool* 33:111–114
38. Shorey HH, Hale RL (1965) Mass-rearing of the larvae of nine Noctuid species on a simple artificial medium. *J Econ Entomol* 58:522–524
39. Smith RA, Barry JW (1998) Environmental persistence of *Bacillus thuringiensis* spores following aerial application. *J Invertebr Pathol* 71:263–267
40. Smith RA, Couche GA (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl Environ Microbiol* 57:311–315
41. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore
42. Thiery I, Frachon E (1997) Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. In: AL Lacey (ed) *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, London. pp 55–77
43. Thomas DJI, Morgan AW, Whipps JM, Saunders JR (2000) Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Appl Environ Microbiol* 66:118–124
44. Thomas DJI, Morgan AW, Whipps JM, Saunders JR (2001) Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol* 67:330–338
45. Tinoco-Ojanguren C, Pearcy RW (1993) Stomatal dynamics and its importance to carbon gain in two rainforest *Piper* species I VPD effects on the transient stomatal responses to lightflecks. *Oecologia* 94:288–294
46. Van Frankenhuyzen K (1993) The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: P Entwistle, JS Cory, MJ Bailey, A Higgs (eds) *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley and Sons, London, pp 1–35
47. Williams K, Field CB, Mooney HA (1989) Relationships among leaf construction cost, leaf longevity, and light environment in rainforest plants in the genus *Piper*. *Am Naturalist* 133:198–211

3.2. Artículo II

P. Maduell, S. Jara, S. Orduz (2006). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. Journal of Applied Microbiology. 101: 117-124.

ORIGINAL ARTICLE

Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia

S. Jara^{1,2*}, P. Maduell^{1,3*} and S. Orduz^{1,4}

1 Unidad de Control Biológico y Biotecnología, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia

2 Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

3 Unitat de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

4 Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia

Keywords

Bacillus thuringiensis, *Culex quinquefasciatus*, isolate, phylloplane, soil, *Spodoptera frugiperda*.

Correspondence

S. Orduz, Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Medellín, Colombia. E-mail: sorduz@cib.org.co

*Both the authors contributed equally to this article.

2005/0907: received 10 August 2005, revised 1 November 2005 and accepted 30 November 2005

doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02901.x

Abstract

Aims: To evaluate the distribution of *Bacillus thuringiensis* strains from maize and bean phylloplane and their respective soils.

Methods and Results: *B. thuringiensis* was isolated from the phylloplane and soil of maize and bean from three municipalities in Antioquia, Colombia. Ninety six samples of phylloplane and 24 of soil were analyzed. A total of 214 isolates were obtained from 96 phylloplane samples while 59 isolates were recovered from 24 soil samples. Sixty five per cent and 12% of the phylloplane and soil isolates, respectively, showed activity against *Spodoptera frugiperda*. These isolates contained δ -endotoxin proteins of 57 and 130 kDa. The most toxic isolates against *S. frugiperda* had the genotype *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1B*, and *cry1D*. In contrast, 27% of the phylloplane isolates and 88% of the soil isolates were active against *Culex quinquefasciatus* and had protein profiles similar to *B. thuringiensis* serovar. *medellin* and *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. The most active isolates contain *cry4* and *cry11* genes.

Conclusions: The predominant population of *B. thuringiensis* on the phylloplane harbored the *cry1* gene and was active against *S. frugiperda*, whereas in soil, isolates harboring *cry11* gene and active against *C. quinquefasciatus* were the majority.

Significance and Impact of the Study: The predominance of specific *B. thuringiensis* populations, both on the leaves and in the soil, suggests the presence of selection in *B. thuringiensis* populations on the studied environment.

Introduction

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive, spore-forming bacterium, which during the sporulation phase produces a protein crystal. The crystal proteins (*cry* and *cyt*) are toxic against a large number of insects, mainly species of the Lepidoptera, Diptera and Coleoptera orders (Feitelson *et al.* 1992; Schnepf *et al.* 1998), some of which are important pests in agriculture or vectors of human diseases. The insecticidal *cry* proteins are produced as protoxins, encoded by genes located in large plasmids (Lereclus *et al.* 1993) and are classified depending on the degree of evolutionary divergence (Crickmore *et al.* 1998).

Bacillus thuringiensis has been isolated from different natural sources, as soil (Ohba and Aizawa 1986b; Martin and Travers 1989; Orduz *et al.* 1992; Chilcott and Wigley 1993; Kim *et al.* 1998; Arango *et al.* 2002), dead or sick insects (Kaelin *et al.* 1994; Bernhard *et al.* 1997), stored plant products (Meadows *et al.* 1992; Hongyu *et al.* 2000), phylloplane (Smith and Couche 1991; Ohba 1996; Damgaard *et al.* 1997; Mizuki *et al.* 1999; Maduell *et al.* 2002) and other natural sources (Hegelson *et al.* 1998; Iriarte *et al.* 1998). There is no clear understanding of the behaviour of this bacterium in the environment. Some studies have suggested that a mechanism of selection of different *B. thuringiensis* strains especially toxic against insects of the Lepidoptera order could be present in the

phylloplane (Smith and Couche 1991; Ohba 1996; Damgaard *et al.* 1997; Mizuki *et al.* 1999). The objective of this study was to address the distribution of *B. thuringiensis* in different habitats in a particular region of Colombia and to associate properties of the strains recovered with the habitat from which they were isolated. The characteristics of *B. thuringiensis* on the leaves of maize and bean and in their respective soils were therefore investigated.

Materials and methods

Sample collection

Leaf and soil samples from maize and bean fields in three municipalities (Marinilla, El Santuario and Carmen de Viboral) located in the east of the Department of Antioquia in Colombia were collected. The municipalities are located at 2150 m above sea level, with an average temperature of 17°C, an annual precipitation of 2500–2800 mm and similar biomes (Espinal 1992). From each municipality, four maize and four bean sampling areas were defined. In each sampling area, leaves from four plants were collected, *c.* at 1.50 m above the soil. At the time of sampling, maize plants were 5 months old, while bean plants were 4 months old. Soil samples were also collected at the same time as leaf sampling, under the plants at a depth of 5 cm. All soils from a given sampling site were mixed, enabling the detection of relationships between the isolates obtained from the leaves and their respective soils. None of the sampling areas had been previously treated with *B. thuringiensis*. Each soil and leaf sample was placed in a sterile and hermetically sealed plastic bag and was transported to the laboratory at 4°C. Conductivity of the soil samples ranged between 81.4 and 90.3 $\mu\text{s cm}^{-1}$, pH ranged between 5.1 and 5.6, organic matter between 3.2 and 3.9 g 100 g⁻¹ of soil and carbon content between 2.2 and 2.7 g 100 g⁻¹ of soil.

Bacillus thuringiensis isolation

To isolate *B. thuringiensis* from leaf surfaces, the technique described by Smith and Couche (1991) was used. Leaves of areas 120 cm² were cut into fragments of *c.* 5 mm², suspended in 10 ml of Luria Bertani (LB) and incubated for 4 h at 30°C while shaking on an environmental shaker at 200 rev min⁻¹. Two 2-ml aliquots were then taken from the resulting suspension, one of which was treated at 80°C for 3 min. After serial dilutions, 100 μl from both aliquots were plated on LB and incubated at 30°C for 24 h. Each *B. thuringiensis*-like colony was transferred into a 5 ml tube with M1 liquid sporulation medium (Ordúz *et al.* 1992) and incubated with shaking (200 rev min⁻¹) for 48 h at 30°C. The suspension of

spores and crystals (final whole culture, FWC) was examined by phase contrast microscopy to verify culture purity and to determine the presence and shape of crystals. FWC were stored at -20°C until further characterization.

Half a gram of each mixed soil sample was suspended in 10 ml of LB medium and vortexed for 1 min. Two milliliters of the resulting suspension were treated at 80°C for 3 min, and 100 μl of the serial dilutions were plated on LB and incubated at 30°C for 24 h. Each *B. thuringiensis*-like colony was treated like *B. thuringiensis* colonies recovered from leaves.

PCR analysis

The procedure described by Cerón *et al.* (1995) was used to extract DNA from cultures, with some modifications. Each isolate was grown on LB plates for 12 h, and a loop of cells was transferred to an Eppendorf tube with 200 μl of distilled and sterile water. The suspension was frozen at -70°C for 30 min and then immediately after that, it was incubated at 100°C for 10 min and centrifuged for 40 s. The resulting supernatant was used in the PCR reaction.

To identify *cry1A*, *cry3*, *cry4* and *cry11* genes in the isolates, DNA was amplified with Lep, Col, Dip and Gral-cry11 primer sets, respectively (Carozzi *et al.* 1991; Bravo *et al.* 1998). CJ1-7, CJ8-13 and CJ14-19 primers (Cerón *et al.* 1994, 1995) were also used to detect the presence of specific *cry1* genes (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* and *cry1Ad*; *cry1B*, *cry1C* and *cry1D*; and *cry1E*, *cry1F* and *cry9A*) (Cerón *et al.* 1994, 1995). PCR reaction mixtures contained: buffer (Tris-HCl buffer 100 mmol l⁻¹, KCl 500 mmol l⁻¹, pH 8.5), MgCl₂ 2.5 mmol l⁻¹, 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of each dNTP, 0.2–0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of each primer, 1 μl of *Taq* polymerase and 1–2 μl of DNA, for a final volume of 25 μl completed with water. Amplification conditions were as follows: a denaturation step for 5 min at 94°C, 35 cycles (for general primers) and 40 cycles (for specific primers): denaturation 45 s at 94°C, annealing 45 s at 45°C for Lep and Gral-Cry11 primers, 45 s at 54°C for Dip primers, 45 s at 46°C for Col and 45 s at 48°C for the specific primers, extension 1 min at 72°C, and finally an extra step of extension 10 min at 72°C. Later, PCR products were separated by electrophoresis in 1% agarose gel (for general primers) and in 2% agarose gel (for specific primers). Positive controls were *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* (HD1) (*cry1Aa*, *cry1Ab* and *cry1Ac*), *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (IPS-82) (*cry4*), *B. thuringiensis* serovar *morrisoni* patovar *tenebrionis* (*cry3*), *B. thuringiensis* serovar *medellin* (*cry11*), *B. thuringiensis* serovar *aizawai* (HD137) (*cry1Aa*, *cry1B*, *cry1C* and *cry1D*), *B. thuringiensis* serovar *tolworthi* (HD125) (*cry1E*) and *B. thuringiensis* serovar *galleriae* (*cry1F* and *cry9A*).

Crystal protein characterization

Five milliliters of the FWC were centrifuged at 10 000 rev min⁻¹ for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in 1 mol l⁻¹ NaCl and was incubated for 1 h at 30°C while shaking at 250 rev min⁻¹. The resulting solution was centrifuged for 5 min at 10 000 rev min⁻¹ and 5°C, and the pellet was washed three times with a cold washing solution (PMSF 1 mmol l⁻¹ and EDTA 10 mmol l⁻¹), under the same centrifugation conditions. The resulting pellet was resuspended in an alkaline solution (NaOH 50 mmol l⁻¹M) and was incubated for 1 h at 250 rev min⁻¹ and 30°C. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad) (Bradford 1976). The protein profile of highly toxic isolates were examined by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) following standard procedures. These isolates were also analysed by Western blot using mouse polyclonal antibodies against crystal proteins of *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, *medellin* and *israelensis*. Anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugated was used as the secondary antibody and the reaction was developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and nitroblue tetrazolium (Sambrook *et al.* 1989; Segura *et al.* 2000).

Bioassays

Biological activity of *B. thuringiensis* isolates was evaluated against third-instar *Culex quinquefasciatus* larvae. Ten larvae were placed in plastic cups with 100 ml of water, and later 100 µl of FWC were added. These cups were incubated for 24 h at 30°C and the mortality then registered. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* was used as a positive control and sterile water was used as a negative control. The biological activity of all the isolates against first-instar *Spodoptera frugiperda* larvae was also determined. Four hundred microlitre of FWC were placed on the surface of a solid diet in small plastic cups (Shorey and Hale 1965); once dried, five larvae of *S. frugiperda* were placed on the solid diet surface. The mortality was registered after 72 h incubation at 30°C. *Bacillus thurin-*

giensis serovar *aizawai* (HD137) was used as positive control and sterile water was used as a negative control. Both bioassays were performed with four replicates of each dose in each treatment.

The isolates that conferred more than 95% of mortality in the preliminary bioassays were further investigated to determine their toxicity range that was calculated using FWC serial dilutions (10⁰–10⁻⁵) following the above-mentioned procedure. Those isolates that conferred toxicity at high dilutions were selected to determine the half lethal concentration (LC₅₀) and the half lethal dose (LD₅₀) in further bioassays, using the same methodology as before. The values were calculated by Probit analysis with a computer program designed by Raymond (1985).

Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) was performed using different variables (municipalities, crystal morphology, presence of *cry* genes, protein profile and toxicity against *S. frugiperda* or *C. quinquefasciatus*). The STATISTICA program (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA) was used.

Results

Bacillus thuringiensis isolation

Bacillus thuringiensis was found on 51% of the leaf samples (27 of 48 from maize and 22 of 48 from bean) and in 33% of the soil samples collected near these plants (3 of 12 of maize and 5 of 12 of bean) (Table 1). Relatively low numbers of cells of *B. thuringiensis* were observed on the maize and bean leaves (0.46 and 1.5 spores cm⁻², respectively), while 42 and 316 spores were recovered per gram of soil near the maize and the bean plants, respectively. The highest number of isolates (54% of the phylloplane and 66% soil isolates) was obtained from samples collected in El Santuario municipality. Fifty-six per cent of the isolates from the phylloplane were obtained after heat shock (Table 1). Two crystal morphologies were mainly found in the *B. thuringiensis* isolates. Isolates with

Table 1 Distribution and frequency of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) isolates from maize and bean leaves and soils in Marinilla, El Santuario and Carmen de Viboral (Colombia)

	Phylloplane			Soil			Total
	Maize	Bean	Subtotal	Maize	Bean	Subtotal	
Number of <i>Bt</i> -positive samples (%)	27 (65)	22 (46)	49 (51)	3 (25)	5 (42)	8 (33)	57 (47)
Number of <i>Bt</i> isolates	59*, 76†	61*, 18†	120*, 94†	10	49	59	273

*With heat shock (10 min, 80°C).

†Without heat shock.

Table 2 Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from maize and bean leaves and soils in Marinilla, El Santuario and Carmen de Viboral (Colombia)

Source	Number of samples	Number of isolates	Crystal morphology		Gene presence*			Toxicity		
			Bipyramidal	Round	<i>cry1</i>	<i>cry4</i>	<i>cry11</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Nontoxic
Phylloplane	96	217	158	59	146	4	59	141	59	17
Maize	48	135	92	43	80	4	43	76	43	16
Bean	48	82	66	16	66	0	16	65	16	1
Soil	24	59	7	52	7	0	52	7	52	0
Maize	12	10	6	4	6	0	4	6	4	0
Bean	12	49	1	48	1	0	48	1	48	0
Total	120	276	165	111	153	4	111	148	111	17

*None of the isolates amplified with primers for genes *cry3* or *cry9*.

bipyramidal-shape crystals predominated on the phylloplane (73%), whereas in the soil most of the isolates produced rounded crystals (88%); this was especially prominent in the bean soils (Table 2).

Characterization of *cry* genes

Seventy-five per cent of the isolates from the phylloplane harboured a *cry1* gene, while only 1.9% harboured *cry4* genes. In contrast, only 12% of soil isolates harboured a *cry1* gene, and no *cry4* genes were detected in these strains. Furthermore, none of the isolates had *cry3* genes (Table 2). The predominant genotypes in the phylloplane isolates were *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1B* and *cry1D* (41.1%), whereas in the soil, the predominant genotype was *cry11* (88%). None of the isolates harboured *cy1Ad*, *cry1E*, *cry1F*, or *cry9A* genes. In addition, 12 strains, all isolated from the phylloplane, did not yield any amplification products with any of the primers used (Table 3).

Crystal protein determination

Three types of protein profiles were observed in the phylloplane isolates, while only two types of profiles were observed in the soil isolates (Fig. 1). Seventy-three per cent and 12% of the isolates from the phylloplane and soil, respectively, showed a protein profile similar to that of *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, having proteins of c. 67 and 130 kDa. Two per cent of the phylloplane isolates had a protein profile similar to that of *B. thuringiensis* serovar *israelensis*, with proteins of about 30, 68 and 130 kDa. Twenty-five per cent of the phylloplane isolates and 88% of the soil isolates exhibited a protein profile similar to that of *B. thuringiensis* serovar *medellin*, with proteins of 30, 68 and 94 kDa. The isolates in each of the three protein profile groups that exhibited the greatest toxicity to *C. quinquefasciatus* larvae were selected for immunological analysis by Western blot. Mouse polyclonal antibodies recognizing *B. thuringiensis* serovar

Table 3 Genotype frequencies of *Bacillus thuringiensis* isolates from maize and bean leaves and soils in Marinilla, El Santuario and Carmen de Viboral (Colombia)

Genotype	Phylloplane			Soil			Total (%)
	Maize	Bean	Total (%)	Maize	Bean	Total (%)	
<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> , <i>cry1D</i>	14	9	23 (10.7)	5	1	6 (10)	29 (10.6)
<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i>	2	0	2 (0.93)	1	0	1 (2)	3 (1.0)
<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> , <i>cry1D</i>	49	39	88 (41.1)				88 (32.2)
<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i>	10	16	26 (12.1)				26 (9.5)
<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1D</i>	2	1	3 (1.4)				3 (1.0)
<i>cry1B</i> , <i>cry1C</i> , <i>cry1D</i>	1	0	1 (0.5)				1 (0.36)
<i>cry1B</i> , <i>cry11</i>	13	0	13 (6.0)				13 (4.7)
<i>cry1B</i>	2	0	2 (0.93)				2 (0.73)
<i>cry3</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>cry4</i> , <i>cry11</i>	4	0	4 (1.9)	0	0	0	4 (1.5)
<i>cry11</i>	26	14	40 (18.6)	4	48	52 (88)	92 (33.6)
No amplification*	12	0	12 (6.0)				12 (4.0)
Total	135	79	214 (100%)	10	49	59 (100%)	273 (100%)

*They did not amplify any evaluated gene (*cry1*, *cry3*, *cry4* and *cry11*).

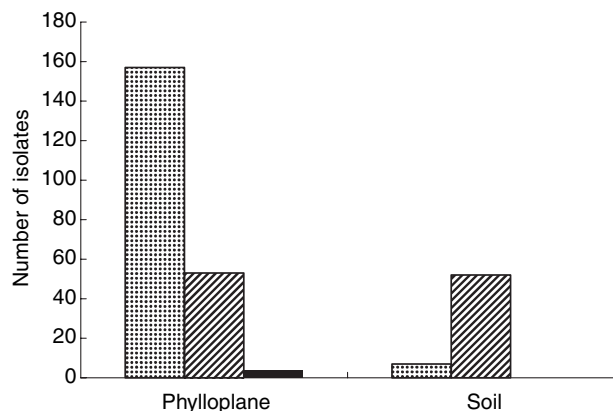


Figure 1 Distribution of the *Bacillus thuringiensis* isolates by their protein profiles from bean and maize phylloplane and soil. ▨, *kurstaki*; ▩, *medellin*; ■, *israelensis*.

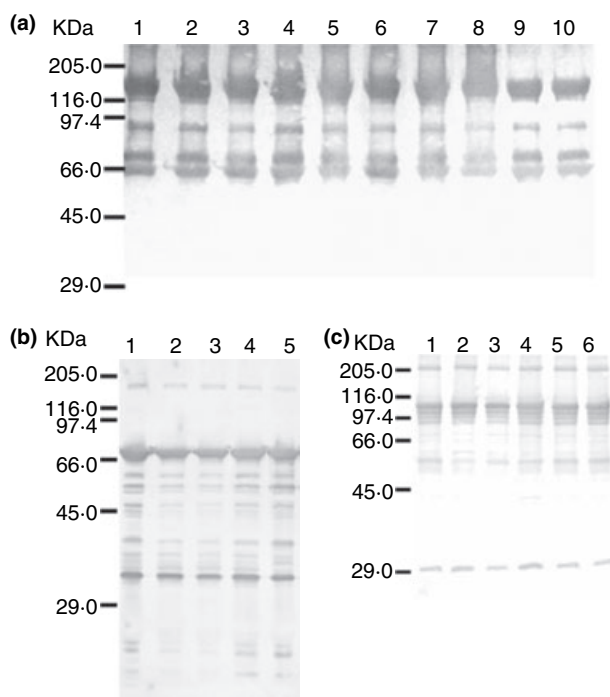


Figure 2 Western blot analysis from *Bacillus thuringiensis* isolates with high toxic activity. (a) Western blot using polyclonal antibodies against crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* produced in mice. Lane 1, *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*; lanes 2–10, *B. thuringiensis* isolates (147-5401, 147-5402, 147-5403, 147-5404, 147-5405, 147-5406, 147-5501, 147-5502 and 147-9003). (b) Western blot using polyclonal antibodies against crystal proteins of *B. thuringiensis* serovar *israelensis* produced in mice. Lane 1, *B. thuringiensis* serovar *israelensis*; lanes 2–5, *B. thuringiensis* isolates (147-0901, 147-3030, 147-3201 and 147-5102). (c) Western blot using polyclonal antibodies against crystal proteins of *B. thuringiensis* serovar *medellin* produced in mice. Lane 1, *B. thuringiensis* serovar *medellin*; lanes 2–6, *B. thuringiensis* isolates (147-4804, 147-13001, 147-13601, 147-8902 and 147-8906).

kurstaki were used to identify isolates 147-5401, 147-5402, 147-5403, 147-5404, 147-5405, 147-5406, 147-5501, 147-5502 and 147-9003 (Fig. 2a, lanes 2–10). Mouse polyclonal antibodies directed against anti-*B. thuringiensis* serovar *israelensis* recognized isolates 147-0901, 147-3030, 147-3201 and 147-5102 (Fig. 2b, lanes 2–5), and mouse polyclonal antibodies directed against *B. thuringiensis* serovar *medellin* recognized isolates 147-4804, 147-13001, 147-13601, 147-8902 and 147-8906 (Fig. 2c, lanes 2–6).

Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates

Sixty-five per cent of the phylloplane isolates were toxic to *S. frugiperda*, 27% were active against *C. quinquefasciatus*, while 8% were not toxic to any of the insect species evaluated. In contrast, 88% of the soil isolates were active against *C. quinquefasciatus* and only 12% were toxic to *S. frugiperda*. No isolate, either from the phylloplane or from the soil, was toxic to both of the insect species evaluated (Table 2).

The LD₅₀ of the isolates with the highest toxicity against *S. frugiperda* larvae varied between 29 and 1386 ng cm⁻² (Table 4). All these isolates were isolated from bean leaves and produced bipyramidal crystals. In contrast, the LC₅₀ of the isolates with the greatest activity against *C. quinquefasciatus* larvae varied between 1.7 and 33 ng ml⁻¹ (Table 4). These isolates were all recovered from maize leaves and produced rounded crystals.

Statistical analysis

No significant differences were found between either the origin of the isolates (phylloplane, soil or different municipalities) or the species studied (maize or bean) in relation to the absolute number of *B. thuringiensis* cells recovered. When the different characteristics of the isolates (crystal morphology, presence of *cry* genes, protein profile and toxicity) were analysed in all the cases, statistically significant differences were found ($P \leq 0.05$). In the phylloplane isolates, bipyramidal crystal morphology, presence of *cry1* genes, 67 and 130 kDa protein profile and biological activity against *S. frugiperda* was statistically predominant; while in the soil isolates, round crystal morphology, *cry11* gene, 30, 68 and 94 kDa protein profile and activity against *C. quinquefasciatus* predominated.

Discussion

Since its discovery, *B. thuringiensis* has been primarily recovered from soil, where it has been widely found (Ohba and Aizawa 1986b; Martin and Travers 1989; Orduz et al. 1992; Chilcott and Wigley 1993; Kim et al. 1998; Arango et al. 2002). However, other groups and we

Isolate number	LD ₅₀ , 95CI (ng cm ⁻²)	LC ₅₀ , 95CI (ng ml ⁻¹)	Genotype
<i>B. t. a.</i>	106, 52–215	–	cry1Aa, cry1B, cry1C, cry1D
147-5406	29, 8–92	–	cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D
147-5402	36, 13–83	–	cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D
147-5501	36, 0.9–138	–	cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D
147-5401	49, 25–96	–	cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D
147-5502	54, 24–116	–	cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D
147-5404	77, 15–250	–	cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D
147-5403	192, 172–420	–	cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D
147-5405	1386, 616–3245	–	cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D
<i>B. t. i.</i>	–	4.3, 3.7–5.0	cry4, cry11
147-0901	–	1.7, 0.2–2.7	cry4, cry11
147-3201	–	2.1, 1.8–2.6	cry4, cry11
147-3030	–	4.0, 3.4–4.7	cry4, cry11
147-8906	–	4.3, 0.4–9.6	Cry11
147-8902	–	7.1, 5.7–8.8	Cry11
147-5102	–	33, 14.8–109	cry4, cry11

*LD₅₀, 50% lethal dose; 95CI, 95% confidence interval; LC₅₀, 50% lethal concentration; *B. t. a.*, *B. thuringiensis* serovar *aizawai*; *B. t. i.*, *B. thuringiensis* serovar *Israelensis*.

have also found *B. thuringiensis* on the leaves of different plant species (Smith and Couche 1991; Maduell *et al.* 2002), suggesting that aerial plant surfaces could also be a natural habitat for *B. thuringiensis*. In fact, as demonstrated in this study, *B. thuringiensis* can be more readily isolated from the phylloplane than from the soil, as it was found in more than 50% of the leaves sampled but in only 30% of soil samples (Table 1). On the phylloplane, the number of *B. thuringiensis* spores recovered varied greatly (from undetectable to 34 cells cm⁻²), somewhat less than that reported in other studies (Smith and Couche 1991; Maduell *et al.* 2002). The number of spores recovered from soil was also smaller than that reported previously (Damgaard 2000).

The predominant *cry* gene in the isolates from the phylloplane was *cry1* type (Table 2), confirming the report of Maduell *et al.* (2002) from phylloplane samples and those of Ben-Dov *et al.* (1997) and Bravo *et al.* (1998) for soil samples. As in the studies of Maduell *et al.* (2002), Chak *et al.* (1994) and Ben-Dov *et al.* (1997), we did not find any isolates with *cry3A* genes in the phylloplane, confirming that this gene family has a reduced frequency in this habitat. *cry11* gene was the second most frequent *cry* gene recovered from the phylloplane isolates, whereas it was the most predominant in soil. Bravo *et al.* (1998) also found a predominance of *cry1* genes and a less frequency of *cry3* and *cry11* genes in soil isolates of *B. thuringiensis*. In our study, the predominant genotypes in the phylloplane isolates from maize and bean were cry1Aa, cry1Ac, cry1B and cry1D. These genotypes were found in all the sites sampled. Maduell *et al.* (2002) reported the most frequent genotypes to be cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad and cry1B in leaf samples from a variety of plants in Colombia. On the contrary, Chak

Table 4 Toxicity and genotype of *Bacillus thuringiensis* isolates with the highest toxic activity against *Spodoptera frugiperda* and *Culex quinquefasciatus* larvae*

et al. (1994) found that the cry1Aa, cry1Ab and cry1Ac genotypes predominated in mountainous zones, whereas genotypes cry1Aa and cry1Ac were equally distributed in all sample areas. Our data combined with the published reports mentioned above confirm that *cry1* genes are worldwide in their distribution. It is important to note that 13 isolates with a combination of *cry1B* and *cry11* genes were found in the present study. All these strains were isolated from maize leaves in the three sample sites, although six of them came from the same plant; all were toxic against Lepidoptera and they were not toxic against Diptera. This combination of genes (*cry1* and *cry11*) is not very frequent, but it was previously reported by Maduell *et al.* (2002).

Isolates 147-0901, 147-3030, 147-3201 and 147-5102 harboured *cry4* and *cry11* genes; these isolates were selected by their high toxicity to third-instar *C. quinquefasciatus* larvae. Interestingly, isolates 147-0901 and 147-3201 exhibited higher toxicity towards these insects than the positive type strain, *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (Table 4), although these four isolates had a protein profile similar to the type strain. On the contrary, isolate 147-8906, with a protein profile similar to *B. thuringiensis* serovar *medellin* (Fig. 2c, lane 6) and with a cry11 genotype, was exceptionally toxic and similar to *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (Table 4). This finding is interesting because Orduz *et al.* (1992) demonstrated that the toxicity of *B. thuringiensis* serovar *medellin* is c. 10 times less than that of *B. thuringiensis* serovar *israelensis*. It was not possible to establish a correlation between the presence of particular *cry1* genes and the toxicity against Lepidoptera in the *S. frugiperda* active isolates. In contrast, Bravo *et al.* (1998) were able to demonstrate that strains with *cry1C* and *cry1D* genes

had the greatest toxicity against *Spodoptera exigua* and *S. frugiperda* larvae. In the present study, only one isolate (147-3003) carried *cry1C* and *cry1D* genes but its toxicity was not exceptional.

Bacillus thuringiensis isolates from the soil and phylloplane appear to have very different characteristics (Table 2). Leaf strains generally produce bipyramidal crystals (in 73% of the cases), harbour *cry1* genes (in 75% of the cases), have a protein profile similar to that of *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* (73% of the cases) and were toxic against *S. frugiperda* (65% of the cases). In contrast, strains recovered from the soil generally produced rounded crystals (88% of the cases), harboured *cry11* genes (88% of the cases), had a protein profile similar to that of *B. thuringiensis* serovar *medellin* (88% of the cases) and were toxic against *C. quinquefasciatus* (88% of the cases). This suggests that most of isolates found on the phylloplane of both maize and bean, correspond to the *kurstaki* type, while those from soil near these plants are *B. thuringiensis* serovar *medellin*-like. These results are very similar to what has been previously reported in other studies (Smith and Couche 1991; Ohba 1996; Damgaard et al. 1997; Mizuki et al. 1999; Maduell et al. 2002). In all these reports, *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*-like isolates predominated on the phylloplane environment of different plant species. Overall, our results are in concordance with another study (Chilcott and Wigley 1993), in which a high percentage of Diptera-active strains were isolated from different soil samples. However, Ohba and Aizawa (1986a) reported that nontoxic strains (Lepidoptera, Diptera and Coleoptera insects tested) predominated.

The striking difference between *B. thuringiensis* isolates coming from phylloplane and soil, isolated from the same place in the same days, is noteworthy and suggests that the soil is not the origin of the phylloplane isolates. Some factors that differentially affect the growth of or survival of *B. thuringiensis* populations in these two habitats must exist. Our results support the hypothesis of Damgaard et al. (1997) who indicated that *B. thuringiensis* populations on the phylloplane were not exclusively the result of bacterial transference from soils to leaves. Indeed, our results are consistent with the model that strains toxic to defoliators (mainly Lepidoptera) preferentially multiply at their expense on the phylloplane compared with the soil and are an important component of the three-level interaction of plants herbivores and bacterial parasites of insects.

Acknowledgements

The authors thank Dr Steve Lindow for the critical review of the manuscript. This study has been carried out with

the financial support of Colciencias, contract number 023-98 and Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), and by a grant from Agencia Española de Cooperación Internacional (P. M.). The authors thank the Bacteriology Unit, from CIB for their help in the identification of some bacteria.

References

- Arango, J.A., Romero, M. and Orduz, S. (2002) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Appl Microbiol* **92**, 466–474.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E. et al. (1997) Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4883–4890.
- Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D., Roberts, G., Pauli, S., Rodgers, P. et al. (1997) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol* **70**, 59–68.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L. et al. (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4965–4972.
- Carozzi, N., Kramer, V., Warren, G., Evola, S. and Koziel, M. (1991) Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl Environ Microbiol* **57**, 3057–3061.
- Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. and Bravo, A. (1994) PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 353–356.
- Cerón, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L. and Bravo, A. (1995) Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3826–3831.
- Chak, K.-F., Chao, D.-C., Tseng, M.-Y., Kao, S.-S., Tuan, S.-J. and Feng, T.-Y. (1994) Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2415–2420.
- Chilcott, C.N. and Wigley, P.J. (1993) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J Invertebr Pathol* **61**, 244–247.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D. and Dean, D.H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 807–813.

- Damgaard, P.H. (2000) Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* ed. Charles, J.F., Delécluse, A. and Nielsen-LeRoux, C. pp. 23–40. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Damgaard, P.H., Hansen, B.M., Pederson, J.C. and Eilenberg, J. (1997) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *J Appl Microbiol* **82**, 253–258.
- Espinal, L.S. (1992) *Geografía Ecológica de Antioquia. Zonas de Vida*. p. 109. Medellín: Ed. Lealon.
- Feitelson, J.S., Payne, J. and Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology* **10**, 271–275.
- Hegelson, E., Caugant, A.D., Lecadet, M.M., Chen, Y., Mahillon, J., Lövgren, A., Hegna, I., Kvaloy, K. et al. (1998) Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr Microbiol* **37**, 80–87.
- Hongyu, Z., Ziniu, Y. and Wangxi, D. (2000) Composition and ecological distribution of Cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. *J Invertebr Pathol* **76**, 191–197.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M., Andrew, R., Murillo, J., Ferre, J. and Caballero, P. (1998) Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Syst Appl Microbiol* **21**, 97–106.
- Kaelin, P., Morel, P. and Gadani, F. (1994) Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricornis* (F.). *Appl Environ Microbiol* **60**, 19–25.
- Kim, H.S., Lee, D.W., Woo, S.D., Yu, Y.M. and Kang, S.K. (1998) Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. *Curr Microbiol* **37**, 195–200.
- Lereclus, D., Delécluse, A. and Lecadet, M.M. (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. ed. Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J. and Higgs, S. pp. 37–69. Chichester: John Wiley & Sons.
- Maduell, P., Callejas, R., Cabrera, K.R., Armengol, G. and Orduz, S. (2002) Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of *Piper* (Piperaceae) in three altitudinal levels. *Microb Ecol* **44**, 144–153.
- Martin, P.A.W. and Travers, R.S. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2437–2442.
- Meadows, P.M., Ellis, D.J., Butt, J., Jarrett, P. and Burges, D. (1992) Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1344–1350.
- Mizuki, E., Ichimatsu, T., Hawng, S.-H., Park, Y.S., Saitoh, H., Higuchi, K. and Ohba, M. (1999) Ubiquity of *Bacillus thuringiensis* on phylloplane of arboreous and herbaceous plants in Japan. *J Appl Microbiol* **86**, 979–984.
- Ohba, M. (1996) *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *J Appl Bacteriol* **80**, 56–64.
- Ohba, M. and Aizawa, K. (1986a) Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *J Invertebr Pathol* **47**, 12–20.
- Ohba, M. and Aizawa, K. (1986b) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J Invertebr Pathol* **47**, 277–282.
- Orduz, S., Rojas, W., Correa, M., Montoya, A. and de Barjac, H. (1992) A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J Invertebr Pathol* **59**, 99–103.
- Raymond, M. (1985) Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah ORSTOM, Sér Ent Méd et Parasitol* **22**, 117–121.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. and Dean, D. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 775–806.
- Segura, C., Guzman, F., Patarroyo, M. and Orduz, S. (2000) Activation pattern and toxicity of the Cry11Bb1 toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *J Invertebr Pathol* **76**, 56–62.
- Shorey, H.H. and Hale, R.L. (1965) Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *J Entomol* **58**, 522–524.
- Smith, R.A. and Couche, G.A. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 311–315.

3.3. Artículo III

P. Maduell, G. Armengol, M. Llagostera, S. Lindow, S. Orduz (2007). Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts. Journal of Applied Microbiology. En prensa.

ORIGINAL ARTICLE

Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts

P. Maduell^{1,2}, G. Armengol¹, M. Llagostera², S. Lindow³ and S. Orduz^{1,4}

1 Biotechnology and Biological Control Unit, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

2 Microbiology Unit, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

3 Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, CA, USA

4 Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Medellín, Colombia

Keywords

Bacillus thuringiensis, bean, growth, leaves, migration, soil.

Correspondence

Gemma Armengol, Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, Faculty of Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain.
E-mail: gemma.armengol@uab.es

Present address

G. Armengol, Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

2006/1443: received 15 October 2006, revised 19 February 2007 and accepted 8 June 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03509.x

Abstract

Aims: We addressed the process of immigration of *Bacillus thuringiensis* from soil to leaves and its capacity to grow on bean diffusate medium (BDM), a medium designed to simulate the nutrient composition of the phylloplane.

Methods and Results: Two different *B. thuringiensis* strains were inoculated into soils, onto seeds or onto lower leaves of bean plants to determine if they were able to disperse to upper leaves under controlled conditions. While *B. thuringiensis* isolates were commonly recovered from leaves exposed to such inocula, populations were very low (<10 CFU cm⁻² of leaf). In addition, the number of cells of *B. thuringiensis* recovered decreased with increasing distance from the soil or from the inoculated leaves. Moreover, *B. thuringiensis* colonies did not grow well on BDM.

Conclusions: This indicates that *B. thuringiensis* disperses poorly from the soil or the seed to the leaves or between leaves of the same plant under controlled conditions. *Bacillus thuringiensis* apparently has greater nutrient requirements than other bacterial species that are prominent inhabitants of the phylloplane.

Significance and Impact of the Study: Finding the mechanisms that favour bacteria colonization on leaves will in turn help to improve the efficacy of bio-control agents against the target pests.

Introduction

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacterium that has been used since the 1940s as a biopesticide. This bacterium has been applied worldwide to control insect pests on a variety of crops. There are different serovars within this species. The most well known serovar, *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*, is used widely in agriculture. This strain produces bipyrimal crystals, harbours mainly *cry1* genes and is toxic to lepidopteran insects. Another interesting serovar is *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*, which is used in the control of human disease vectors, produces round crystals, harbours mainly *cry4* and *cry11* genes and is toxic to dipteran insects.

The ecology of *B. thuringiensis*, particularly in nonhost environments, is poorly understood. Most studies have

been of simple descriptions of the habitats in which it has been collected. Traditionally, *B. thuringiensis* has been considered an inhabitant of the soil (Martin and Travers 1989). However, it has also been found in stored food products (Kaelin and Gadani 2000), marine sediments (Maeda *et al.* 2000), activated sludges (Mizuki *et al.* 2001), as a human opportunistic pathogen (Damgaard *et al.* 1997a), and on leaves of plants (Maduell *et al.* 2002; Nair *et al.* 2002; Uribe *et al.* 2003; Collier *et al.* 2005).

The mechanism that *B. thuringiensis* uses to kill insect larvae is extremely specific, to such an extent that only some strains of this bacterial species are able to attack a given species of insect. This specificity has presumably occurred by a process of co-evolution of *B. thuringiensis* toxin proteins and the midgut receptors of insect larvae (de Maagd *et al.* 2001). Both the bacterium and the insect

target must have shared the same ecological niche to enable such interactions to occur, suggesting that the *B. thuringiensis* varieties that are toxic against lepidopteran larvae must both have inhabited aerial plant parts for a long time. Some authors (Smith and Couche 1991; Ohba 1996; Damgaard *et al.* 1997b; Elliot *et al.* 2000) have proposed that *B. thuringiensis* is a plant mutualist that offers plants protection from phytophagous insect larvae, and that plants provide nutrients and physical environment protection to this bacterium. In such a system, soil may act as a reservoir of bacteria from which *B. thuringiensis* could disperse to leaves (Pedersen *et al.* 1995). There, they would be selected for their ability to kill insects susceptible to their toxins and benefit from colonizing the dead insect. *Bacillus thuringiensis* could later re-colonize the soil from such inocula entering as leaf water runoff, by leaf fall or by insect cadavers. In this study, we have addressed both the capacity of *B. thuringiensis* to disperse from the soil to leaves as well as the capacity of *B. thuringiensis* to grow in defined media mimicking the nutritional conditions found on leaves.

Materials and methods

Strain migration from soil and lower leaves

Strain selection

Two *B. thuringiensis* strains, which had been isolated from phylloplane of different species of *Piper* (Piperaceae) in a previous work (Maduell *et al.* 2002), were used. Strain 146-15702 harbours *cry4* and *cry11* genes, produces parasporal crystals with round morphology, and is toxic against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Strain 146-16807 harbours *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* and *cry1B* genes, produces parasporal crystals with bipyrarnidal morphology, and is toxic against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).

Bacillus thuringiensis transformation

In order to identify the strains more easily, strain 146-15702 was transformed with plasmid pHT315 (Arantes and Lereclus 1991), kindly provided by Dr Didier Lereclus, and strain 146-16807 was transformed with plasmid pSV2 (Crickmore and Ellar 1992), kindly provided by Dr Neil Crickmore. Plasmid pHT315 confers resistance to erythromycin (Ery) and ampicillin and plasmid pSV2 confers resistance to ampicillin and chloramphenicol (Chl). Both plasmids were obtained from an *Escherichia coli* host using the Promega Wizard[®] Plus Minipreps DNA purification system according to the manufacturer's instructions (Promega Corporation, Madison, WI, USA). *Bacillus thuringiensis* cells were prepared for electroporation by growing them at 30°C and 250 rpm until an

OD₆₀₀ of about 0.5 (mid-exponential phase). Cells were then harvested by centrifugation, washed twice in ice-cold water, and resuspended in 1/500 of the original volume in cold sterile water. Fifty microlitres of cells were mixed with 1 µg of plasmid DNA in a chilled 0.2-cm cuvette and were subjected to a single electroporation pulse (capacitance 25 µF, voltage 1.8 kV, resistance 200 Ω) using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). Immediately after the pulse, 1 ml of SOC medium (Bacto tryptone 20 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 0.5 g, 10 ml of KCl 250 mmol l⁻¹, 5 ml of MgCl₂ 2 mmol l⁻¹, 10 ml of glucose 2 mol l⁻¹, per litre) was added and the cell suspension transferred to a sterile tube and incubated at 30°C for 1 h prior to plating on selective media at 30°C. Antibiotic concentrations for bacterial selection were Ery 25 µg ml⁻¹ [for 146-15702 (pHT315)] and Chl 10 µg ml⁻¹ [for 146-16807 (pSV2)]. The plates were kept at 4°C until use.

The plasmid stability was assessed for 48 h and both plasmids proved to be stable. Only about 30% of the *B. thuringiensis* transformed with pSV2, and 35% of the cells of *B. thuringiensis* transformed with pHT315 lost the plasmid after growth during periodic transfers in LB (about 50 generations).

Plant and soil inoculation

Inoculum of the transformed *B. thuringiensis* strains were grown on LB with antibiotics until an OD₆₀₀ of 0.8 resulting in a concentration of about 10⁸ colony forming units (CFU) ml⁻¹. Four treatments of each strain plus the negative control were carried out [treatments 1, 3, 5 and 7 with strain 146-15702 (pHT315) and treatments 2, 4, 6 and 8 with strain 146-16807 (pSV2)]. In treatments 1 and 2, the soil was sterilized by autoclaving (20 min/120°C) and inoculated with *B. thuringiensis* strains separately to obtain a final concentration of about 10⁶ CFU g⁻¹; bean seeds were planted 1 day later. In treatments 3 and 4, the same procedure was followed but inoculum was added to nonsterilized soil. In treatments 5 and 6, bean seeds were dipped into *B. thuringiensis* cultures for 15 min, and then sown into nonsterile soil. In treatments 7 and 8, nontreated bean seeds were sown into nonsterile soil, and after germination (10 days later) leaves were inoculated by spraying with a suspension of *B. thuringiensis*. A group of control plants was treated as above but with no *B. thuringiensis* inoculation. In all treatments the bean seeds were sterilized [distilled water 30 s, 70% alcohol 1 min, sterile water 30 s, sodium hypochlorite (5000 ppm) 1 min, sterile water 30 s and sterile water 30 s] before bacterial inoculation or planting as appropriate. The plants were grown in a greenhouse (mean temperature 21°C, mean relative humidity 77%). Each treatment consisted of five pots of five seeds each, and different treatments were separated

on the bench by transparent plastic curtains to prevent cross-contamination.

Sample collection and B. thuringiensis recovery

Six to seven days after planting of seeds, plants started to bud from soil. Seven days later the plants reached a size so that mature leaves could be collected. At various times after planting of seeds (14, 21 and 28 days for treatments 1–6 or 21, 28 and 35 days for treatments 7 and 8), four individual healthy leaves at their maximum physiological development (10–15 cm²) of each treatment were collected. Leaves were collected from the upper third of the plant. In addition, in treatments 3 and 4, four soil samples (5 g) per treatment were taken 10 and 18 days after sowing at a depth of about 5 cm. *Bacillus thuringiensis* was isolated from leaf samples as previously described (Maduell *et al.* 2002) but omitting the freezing step as all samples were analysed immediately after collection. All isolation procedures were performed at 4°C. Each soil sample consisted of 0.5 g that was suspended in 5 ml of sterile water. After sampling soil and leaf samples were processed similarly. Two 2-ml aliquots were taken from the resulting cell suspension, and one was treated at 80°C for 10 min to select for spores. Appropriate serial dilutions of both aliquots were plated (100 µl) on LB with Ery 25 µg ml⁻¹ [for strain 146-15702 (pHT315)] or Chl 10 µg ml⁻¹ [for strain 146-16807 (pSV2)]. After incubation for 48 h at 30°C, *B. thuringiensis*-like colonies were transferred into a 5-ml tube with M1 liquid sporulation medium (Orduz *et al.* 1996) with antibiotics and were incubated at 30°C, 200 rpm for 48 h. The selected colonies were checked by phase-contrast microscopy for the presence of parasporal crystals typical of the inoculated *B. thuringiensis* strain and stored at -20°C until they were analysed. This spore suspension was designated as the final whole culture.

The population of spores and/or viable cells per weight (soils) or area (leaves) was calculated from estimates of the number of culturable cells from the two highest dilutions in which *B. thuringiensis* was isolated. An analysis was carried out to evaluate the contribution of treatments, strains and days of sampling to differences in the number of CFU cm⁻² of leaf by analysis of variance (ANOVA) using the software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Isolate characterization

To confirm that recovered isolates corresponded to the inoculated strains, PCR was performed to verify the presence of particular *cry* genes. Half of the cells obtained from the sampling of each strain and treatment were plated on LB medium with antibiotics. After 18 h incubation, a loopful of cells was collected and re-suspended in 200 µl of sterile water. The cell suspensions were stored

at -20°C for 2 h and then immediately placed in a 100°C bath for 10 min, centrifuged for 45 s at 13 000 g, and the supernatants containing total DNA were recovered. General primers *gral-cry1* and *gral-cry11* (Bravo *et al.* 1998) were used to detect the presence of *cry1* and *cry11* genes, respectively. The PCR mixtures contained 1x PCR buffer (50 mmol l⁻¹ KCl, 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.8), 2.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 200 µmol l⁻¹ of each dNTP, 0.2–0.4 µmol l⁻¹ of each primer, 0.5–2 µl *Taq* polymerase, 1–2.5 µl of DNA, and the volume was completed to 25 µl with sterile H₂O. The amplification conditions were as follows: a denaturation step for 5 min at 94°C; 35 cycles of denaturation 45 s at 94°C, annealing 45 s at 49°C (for *gral-cry1*) or 45°C (*gral-cry11*), and a 1 min extension at 72°C; finally, an extra extension step of 6–10 min was carried out at 72°C. After amplification, DNA fragments were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel at 100 V for 45 min. *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* for *gral-cry1* and *B. thuringiensis* serovar. *medellin* for *gral-cry11* were used as positive controls.

Growth of epiphytic bacteria in vitro

Bacillus thuringiensis strains 146-15702 and 146-16807 as well as the commercial strain HD1, and 10 epiphytic bacteria were used. These epiphytic bacteria were isolated from bean fields in the region of Antioquia, Colombia, as previously reported (Maduell *et al.* 2002); they were identified as: *B. mycooides*, *B. amyloliquefasciens*, *B. licheniformis* (isolates F23 and F29), *B. subtilis*, *Pseudomonas syringae* pv *sesami*, *P. viridiflava* (isolates F4 and F12), *P. syringae* pv *syringae*, and *P. syringae* pv *zizante*, by using the Biolog system (Biolog Inc., Hayward, CA). A loopful of cells grown on LB plates was suspended in 200 µl of sterile water. Ten microlitres from each suspension were placed on the centre of both an LB plate and a bean diffusate medium (BDM) plate. BDM is a medium designed to simulate the nutrient composition of the phylloplane (Lindow 1988). At 24, 48, 120 and 168 h the growth of the resulting colony was measured. Three replicas per strain and medium were performed. Differences in the growth of the various strains throughout time on the two media were assessed by ANOVA using the software SPSS (SPSS Inc.).

Results

Strain migration from soil and lower leaves

The number of cells of *B. thuringiensis* recovered from the upper leaves of bean was very low irrespective of whether inoculum had been placed in soil, on seeds, or inoculated onto lower leaves of the plants; in all cases, less than about 10 CFU cm⁻² were recovered. The num-

ber of cells recovered from leaves varied only slightly with sampling time and with bacterial strain (Fig. 1). The highest recovery (9 CFU cm^{-2}) was from plants grown in sterile soil inoculated with strain 146-15702 (pHT315)

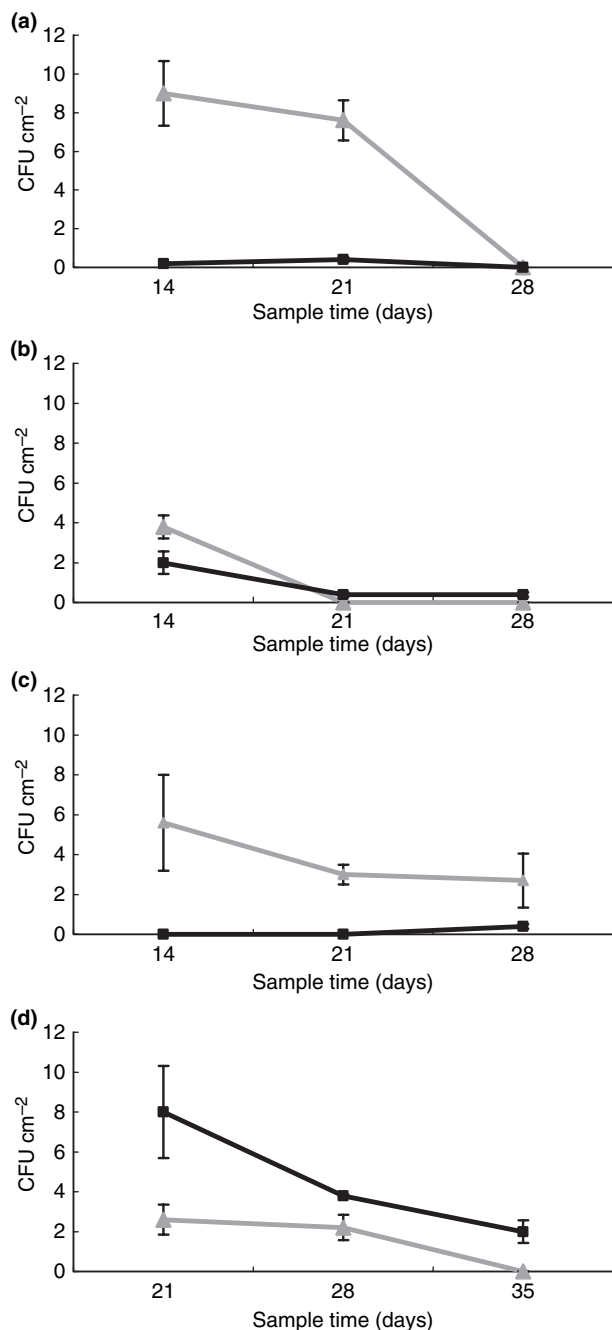


Figure 1 Population size of *Bacillus thuringiensis* 146-16807 (pSV2, ■) and 146-15702 (pHT315, ▲) per unit of area of leaf on different sampling times after planting of seeds. (a) Inoculated into sterile soil; (b) inoculated into nonsterile soil; (c) inoculated onto seeds; and (d) inoculated onto bottom leaves.

when sampled 14 days after seedtime (Fig. 1a), and when strain 146-16807 (pSV2) was inoculated onto lower leaves (8 CFU cm^{-2}) when sampled 21 days after planting (Fig. 1d). *Bacillus thuringiensis* was not recovered from any uninoculated control plants.

Treatments with strain 146-15702 (pHT315) exhibited a progressive decrease of the number of cells recovered after initial dispersal in all the treatments as the time of sampling advanced, that is, as more distant leaves were analysed. This reduction was very sharp in the treatment where sterile soil was inoculated with *B. thuringiensis*, where populations from leaves collected on day 28 were significantly lower than on days 14 or 21 ($P = 0.044$) (Fig. 1a). In the treatment where nonsterile soil was inoculated with *B. thuringiensis* statistically significant differences between day 14 and days 21 and 28 were also observed ($P = 0.004$) (Fig. 1b). In the treatment where seeds were soaked with *B. thuringiensis* and then planted in nonsterile soil and the treatment where *B. thuringiensis* was inoculated onto lower leaves, populations remained similar over all sampling times (Fig. 1c,d). No differences were observed between the four different treatments with strain 146-15702 (pHT315).

Treatments with strain 146-16807 (pSV2) exhibited very low and similar number of cells recovered after dispersal whether on plants exposed to sterile soil inoculated with *B. thuringiensis*, nonsterile soil inoculated with *B. thuringiensis*, or grown from seeds soaked with *B. thuringiensis* and sowed in nonsterile soil (Fig. 1). Nevertheless, when *B. thuringiensis* was inoculated onto lower leaves this strain was present in higher populations than in all other treatments ($P = 0.001$) (Fig. 1d).

Treatments with strain 146-15702 (pHT315) exhibited higher *B. thuringiensis* populations than with strain 146-16807 (pSV2) both when cells were inoculated into sterile soil and when seeds were soaked with *B. thuringiensis* and seeded in nonsterile soil ($P = 0.005$ and 0.048 , respectively) (Fig. 1a,c). In all treatments, epiphytic populations became undetectable by the third sampling date except when seeds were soaked with strain 146-15702 (pHT315) and sowed in nonsterile soil or when strain 146-16807 (pSV2) was inoculated onto lower leaves (Fig. 1c,d). The total population size of *B. thuringiensis* obtained without thermal shock was always higher than the population size of *B. thuringiensis* spores obtained after thermal shock (data not shown). On average, the number of spores was approximately half of the total population size.

The population sizes of *B. thuringiensis* in inoculated soils remained stable at a level near that at the time of inoculation (10^7 CFU g^{-1} of soil) throughout the experiment (day 10 and day 18). Statistically significant differences between the two strains throughout the experiment were not observed.

The crystal morphology and *cry1* and *cry11* gene content of the strains recovered from plants when assessed with PCR always corresponded to the strains that were inoculated (data not shown), indicating that cross-contamination of the plants did not occur during the experiments.

Comparative *in vitro* growth of epiphytic bacterial strains

The relative growth of *B. thuringiensis* and other common epiphytic bacteria were compared on a rich medium (LB) and on a medium that mimics the composition and concentration of leaf surface nutrients (BDM) to evaluate whether the low recovery of *B. thuringiensis* was associated with poor growth on plants subsequent to dispersal. Tables 1 and 2 show the results of bacterial growth with time on LB and BDM media, respectively. *Bacillus thuringiensis* 146-15702 exhibited the highest growth of all strains on LB while the other *B. thuringiensis* strains also grew very rapidly on this medium. The other *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. exhibited substantially lower growth than the *B. thuringiensis* strains (Table 1). In contrast, on BDM, the growth of *B. thuringiensis* strains was much lower than all other strains (Table 2). When all the strains were grouped (*B. thuringiensis*, *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp.), it could easily be seen that the growth of *B. thuringiensis* was much greater than *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. on LB (Fig. 2a) but much lower than these strains on BDM (Fig. 2b).

giensis 146-15702 exhibited the highest growth of all strains on LB while the other *B. thuringiensis* strains also grew very rapidly on this medium. The other *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. exhibited substantially lower growth than the *B. thuringiensis* strains (Table 1). In contrast, on BDM, the growth of *B. thuringiensis* strains was much lower than all other strains (Table 2). When all the strains were grouped (*B. thuringiensis*, *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp.), it could easily be seen that the growth of *B. thuringiensis* was much greater than *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. on LB (Fig. 2a) but much lower than these strains on BDM (Fig. 2b).

Discussion

The natural populations of *B. thuringiensis* on leaves are about 10^2 CFU cm^{-2} of leaf (Smith and Couche 1991; Maduell et al. 2002; Collier et al. 2005). These bacteria

Table 1 Growth of bacterial colonies on LB plates measured in mm throughout time

Bacterial strains	Mean growth (SD)			
	24 h	48 h	120 h	168 h
<i>Bacillus thuringiensis</i> 157/02	8 (0.8)	14 (1.3)	23 (2)	25 (2.9)
<i>B. thuringiensis</i> 168/07	6.8 (0.9)	11 (1.1)	17 (1.2)	19 (1.6)
<i>B. thuringiensis</i> serovar. <i>kurstaki</i> HD1	6.3 (0.7)	9.8 (0.9)	16 (1.1)	20 (2.0)
<i>B. licheniformis</i> F23	1.3 (0.6)	2.3 (0.6)	4.3 (1.5)	6.3 (0.6)
<i>B. subtilis</i> F24	2.3 (0.6)	3.3 (1.2)	6 (1.0)	7.7 (0.6)
<i>B. amyloliquefasciens</i> F26	2.7 (0.6)	4 (0.1)	4.7 (0.6)	5.7 (0.6)
<i>B. licheniformis</i> F29	2 (1.0)	3.7 (2.1)	4.7 (2.1)	5.7 (1.5)
<i>B. mycooides</i> F30	4.3 (0.6)	7.7 (0.6)	14 (0.6)	16 (1.4)
<i>Pseudomonas syringae</i> patovar. <i>sesami</i> F3	2 (1.0)	2.3 (0.6)	4.3 (0.6)	5.7 (0.6)
<i>P. viridiflava</i> F4	3 (0.0)	5.7 (0.6)	13 (1.5)	18 (2.0)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>syringae</i> F8	2.3 (0.6)	4.3 (1.5)	14 (2.1)	16 (3.2)
<i>P. viridiflava</i> F12	1.3 (0.6)	2 (0.1)	5 (0.1)	6.7 (0.6)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>zizante</i> F14	1.3 (0.6)	2.3 (0.6)	4.7 (1.2)	6.7 (1.2)

Table 2 Growth of bacterial colonies on BDM plates measured in mm throughout time

Bacterial strains	Mean growth (SD)			
	24 h	48 h	120 h	168 h
<i>Bacillus thuringiensis</i> 157/02	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>B. thuringiensis</i> 168/07	0 (0.0)	0 (0.0)	0.4 (0.7)	0.9 (1.1)
<i>B. thuringiensis</i> serovar. <i>kurstaki</i> HD1	0 (0.0)	0 (0.0)	2.4 (0.8)	4 (1.3)
<i>B. licheniformis</i> F23	1.7 (0.6)	3.7 (1.2)	7.3 (1.2)	9.3 (2.1)
<i>B. subtilis</i> F24	1.7 (0.6)	1.7 (0.6)	2.3 (0.6)	2.7 (0.6)
<i>B. amyloliquefasciens</i> F26	1.3 (0.6)	2 (1.0)	4.7 (0.6)	5.3 (0.6)
<i>B. licheniformis</i> F29	2 (1.0)	2.7 (0.6)	5 (1.0)	5.7 (0.6)
<i>B. mycooides</i> F30	1.7 (0.6)	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Pseudomonas syringae</i> patovar. <i>sesami</i> F3	1.3 (0.6)	1.7 (0.6)	6.7 (1.2)	7.3 (1.5)
<i>P. viridiflava</i> F4	2 (0.0)	2.7 (0.6)	5.7 (0.6)	6.3 (1.2)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>syringae</i> F8	2 (0.1)	3.7 (1.2)	6.7 (2.1)	7.3 (1.5)
<i>P. viridiflava</i> F12	1.7 (0.6)	3.7 (1.5)	7.3 (2.5)	8.3 (2.5)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>zizante</i> F14	1.3 (0.6)	2 (0.1)	4.7 (1.2)	5.7 (0.6)

n.d., not done.

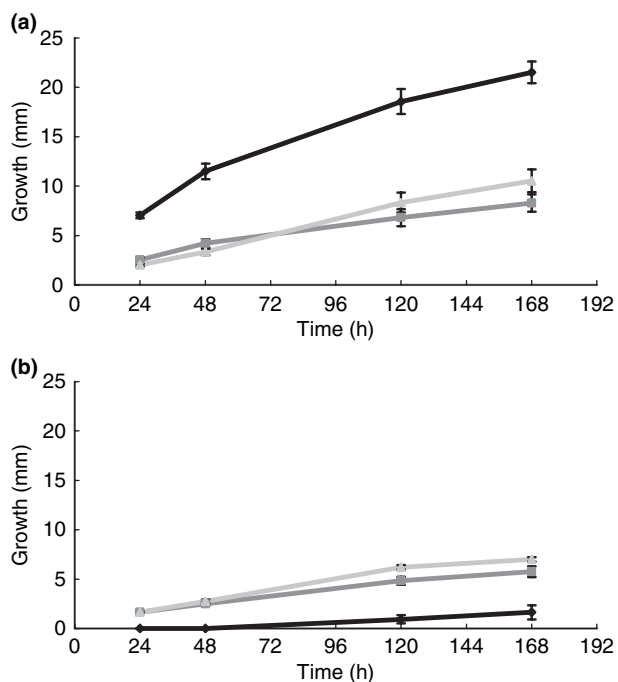


Figure 2 Increase in size of colonies of groups of strains of *Bacillus* spp. (squares), *Pseudomonas* spp. (triangles) and *Bacillus thuringiensis* (diamonds) with time after inoculation of LB plates (a) or BDM plates (b).

may have arrived at the plants through different ways: atmospheric deposition from distant sources, contamination from local soil communities due to movement via wind and rain, deposition of cells from insects, or migration from colonized roots to the leaves, etc. (Lindow and Andersen 1996). In this work, we addressed one of the factors that could favour colonization of leaves that could be simulated under controlled conditions and thus monitored the *B. thuringiensis* dispersal locally from the soil, the seeds and the bottom leaves to the upper leaves of plants under greenhouse conditions. In all treatments, *B. thuringiensis* isolates were recovered from upper leaves, suggesting that all of these reservoirs can contribute to epiphytic populations. Approximately half of these epiphytic populations of *B. thuringiensis* were in the form of spores suggesting that the leaf surface environment was stressful, stimulating spore formation or that the soil or seed environments also had stimulated sporulation prior to dispersal. The fact that the epiphytic populations of *B. thuringiensis* in all treatments were very low suggests that *B. thuringiensis* dispersed poorly from the soil or the seed to the upper leaves or between leaves of the same plant, at least under the conditions used in this study. The possible mechanisms of dispersal were not addressed in the present

study, although some likely explanations exist. This movement might have been associated with endophytic cells, as it has been recently observed for *Rhizobium* spp. in rice plants (Chi *et al.* 2005). Alternatively, the populations of *B. thuringiensis* that were observed on the upper leaves might have been the result of the inoculation of the meristem early in plant development. In general, soil, seed and lower leaf reservoirs were equally efficient in contributing inoculum to upper leaves. Clearly, some dispersal of *B. thuringiensis* is possible in the absence of external dispersal factors such as wind and insects. It is likely, however, that under field conditions that wind and insect movement could have amplified the dispersal observed here and that after longer dispersal periods larger epiphytic populations, mimicking those seen on plants in the field might have been achieved.

The number of isolates in all the treatments diminished progressively throughout the time until arriving at values near or equal to 0 CFU cm⁻². This does not mean that the number of *B. thuringiensis* bacteria diminished in a single leaf, but that the number of *B. thuringiensis* bacteria diminished as leaves more distant from the soil or from the inoculated leaves were analysed. Thus, as the leaves became more distant from the soil, the probability that they had been directly or indirectly (through the apical bud) in contact with spores or cells of *B. thuringiensis* became smaller. Ascending endophytic migration might also decrease as the distance that the bacteria must traverse within the plant increases. When inoculum had been applied to lower leaves the *B. thuringiensis* that was detected in the upper leaves might have been facilitated by inoculation of apical leaf buds.

Strain 146-15702 (pHT315) exhibited a higher ability to move than strain 146-16807 (pSV2) in the treatments in which sterile soil or seeds were inoculated. On the other hand, when nonsterile soils were inoculated no statistically significant differences were observed. When young leaves were inoculated, strain 146-16807 (pSV2) exhibited higher epiphytic populations than strain 146-15702 (pHT315), although the differences were not always significant. In an earlier study, we proposed that the strains with activity against Lepidoptera would be better epiphytes as most of the defoliating insects belong to this order (Jara *et al.* 2006). However, the results of this work show that the strain active against Diptera and the other active against Lepidoptera both had similar abilities to disperse to leaves under our study conditions. It was noteworthy, however, that strain 146-16807 (pSV2) (toxic to Lepidoptera) moved to upper leaves better than the strain toxic to Diptera when young leaves were inoculated. Our results clearly showed that the populations of both *B. thuringiensis* strains tested remained high in the soil throughout these studies. This supports the concept

that as a group, *B. thuringiensis* is well adapted to soil survival (Martin and Travers 1989; Bernhard et al. 1997; Bravo et al. 1998). Moreover, we suggest that soil can be a persistent source of inoculum, allowing *B. thuringiensis* movement to plants, as shown here.

It is noteworthy that *B. thuringiensis* does not grow well in a medium that mimics the amount and types of nutrients on leaves while it grows well in a medium rich in nutrients such as LB. *Bacillus thuringiensis* might therefore be considered a copiotroph and require relatively high concentrations of nutrients for growth, such as those found in dead insects. Its occurrence in other habitats such as soil and on leaves might therefore represent primarily a survival and dispersive mode. Indeed, many of the *B. thuringiensis* cells observed on our plants were in the form of spores that might have been triggered by the low nutrient levels seen on leaves or in the low nutrient levels expected in the soil reservoir. Thus we might expect that *B. thuringiensis*, unlike other *Pseudomonas* spp. and other species of *Bacillus* that often are found in high populations on leaves, might not exhibit substantial growth in this habitat.

Acknowledgements

This study was supported by CODI of the Universidad de Antioquia (IN506CE) and Corporación para Investigaciones Biológicas.

References

- Arantes, O. and Lereclus, D. (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**, 115–119.
- Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers, P., et al. (1997) Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol* **70**, 59–68.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., et al. (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4965–4972.
- Chi, F., Shen, S.H., Cheng, H.P., Jing, Y.X., Yanni, Y.G. and Dazzo, F.B. (2005) Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7271–7278.
- Collier, F.A., Elliot, S.L. and Ellis, R.J. (2005) Spatial variation in *Bacillus thuringiensis/cereus* populations within the phyllosphere of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius*) and surrounding habitats. *FEMS Microbiol Ecol* **54**, 417–425.
- Crickmore, N. and Ellar, D.J. (1992) Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **6**, 1533–1537.
- Damgaard, P.H., Granum, P.E., Bresciani, J., Torregrossa, M.V., Eilenberg, J. and Valentino, L. (1997a) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Immunol Med Microbiol* **18**, 47–53.
- Damgaard, P.H., Hansen, B.M., Pedersen, J.C. and Eilenberg, J. (1997b) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *J Appl Microbiol* **82**, 253–258.
- Elliot, S.L., Sabelis, M.W., Janssen, A., van der Geest, L.P.S., Beerling, E.A.M. and Fransen, J. (2000) Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecol Lett* **3**, 228–235.
- Jara, S., Maduell, P. and Orduz, S. (2006) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. *J Appl Microbiology* **101**, 117–124.
- Kaelin, P. and Gadani, F. (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. *Curr Microbiol* **40**, 205–209.
- Lindow, S.E. (1988) Lack of correlation of antibiosis in antagonism of ice nucleation active bacteria on leaf surfaces by non-ice nucleation active bacteria. *Phytopathology* **78**, 444–450.
- Lindow, S.E. and Andersen, G.L. (1996) Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2978–2987.
- de Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* **17**, 193–199.
- Maduell, P., Callejas, R., Cabrera, K.R., Armengol, G. and Orduz, S. (2002) Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of *Piper* (Piperaceae) in three altitudinal levels. *Microb Ecol* **44**, 144–153.
- Maeda, M., Mizuki, E., Nakamura, Y., Hatano, T. and Ohba, M. (2000) Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Curr Microbiol* **40**, 418–422.
- Martin, P.A. and Travers, R.S. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2437–2442.
- Mizuki, E., Maeda, M., Tanaka, R., Lee, D.W., Hara, M., Akao, T., Yamashita, S., Kim, H.S., Ichimatsu, T. and Ohba, M. (2001) *Bacillus thuringiensis*: a common member of microflora in activated sludges of a sewage treatment plant. *Curr Microbiol* **42**, 422–425.
- Nair, J.R., Singh, G. and Sekar, V. (2002) Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity. *J Appl Microbiol* **93**, 772–780.
- Ohba, M. (1996) Identification of flagellar (H) antigenic subfactors in *Bacillus thuringiensis* H serotypes 10, 18 and 24 isolated in Japan. *Lett Appl Microbiol* **23**, 287–289.
- Orduz, S., Diaz, T., Restrepo, N., Patino, M.M. and Tamayo, M.C. (1996) Biochemical, immunological and toxicologi-

- cal characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**, 231–237.
- Pedersen, J.C., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. and Hansen, B.M. (1995) Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in an experimental cabbage field. *Can J Microbiol* **41**, 118–125.
- Smith, R.A. and Couche, G.A. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl Environ Microbiol* **57**, 311–315.
- Uribe, D., Martinez, W. and Ceron, J. (2003) Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol* **82**, 119–127.

3.4. Artículo IV

P. Maduell, G. Armengol, M. Llagostera, S. Orduz, S. Lindow (2007). *Bacillus thuringiensis* strains are poor colonists of leaf surfaces. *Microbial Ecology*. En prensa.

B. thuringiensis is a Poor Colonist of Leaf Surfaces

Pau Maduell · Gemma Armengol ·
Montserrat Llagostera · Sergio Orduz · Steven Lindow

Received: 11 November 2006 / Accepted: 13 February 2007
© Springer Science + Business Media, LLC 2007

Abstract The ability of several *Bacillus thuringiensis* strains to colonize plant surfaces was assessed and compared with that of more common epiphytic bacteria. While all *B. thuringiensis* strains multiplied to some extent after inoculation on bean plants, their maximum epiphytic population sizes of 10^6 cfu/g of leaf were always much less than that achieved by other resident epiphytic bacteria or an epiphytically fit *Pseudomonas fluorescens* strain, which attained population sizes of about 10^7 cfu/g of leaf. However *B. thuringiensis* strains exhibited much less decline in culturable populations upon imposition of desiccation stress than did other resident bacteria or an inoculated *P. fluorescens*

strain, and most cells were in a spore form soon after inoculation onto plants. *B. thuringiensis* strains produced commercially for insect control were not less epiphytically fit than strains recently isolated from leaf surfaces. The growth of *B. thuringiensis* was not affected by the presence of *Pseudomonas syringae* when co-inoculated, and vice versa. *B. thuringiensis* strains harboring a green fluorescent protein marker gene did not form large cell aggregates, were not associated with other epiphytic bacteria, and were not found associated with leaf structures, such as stomata, trichomes, or veins when directly observed on bean leaves by epifluorescent microscopy. Thus, *B. thuringiensis* appears unable to grow extensively on leaves and its common isolation from plants may reflect immigration from more abundant reservoirs elsewhere.

P. Maduell · G. Armengol · S. Orduz
Biotechnology and Biological Control Unit,
Corporación para Investigaciones Biológicas,
Medellín, Colombia

P. Maduell · M. Llagostera
Microbiology Unit, Department of Genetics and Microbiology,
Universitat Autònoma de Barcelona,
Barcelona, Spain

S. Orduz
Universidad Nacional de Colombia sede Medellín,
Medellín, Colombia

S. Lindow (✉)
Department of Plant and Microbial Biology,
University of California,
Berkeley, CA, USA
e-mail: icelab@berkeley.edu

Present address:
G. Armengol
Department of Animal Biology, Vegetal Biology and Ecology,
Universitat Autònoma de Barcelona,
Barcelona, Spain

Introduction

Bacillus thuringiensis is a spore-forming, Gram-positive bacterium that produces proteinaceous parasporal inclusions, which often exhibit specific insecticidal activities against insect larvae. Preparations based on this bacterium are used commercially to control pest insects belonging to the orders Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera, and exploit *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*, *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*, and *B. thuringiensis* serovar. *tenebrionis*, respectively. Although much is known about *B. thuringiensis* entomopathogenicity, little is known about its behavior in the natural environment. Traditionally, *B. thuringiensis* has been considered primarily an inhabitant of the soil [19]. However, it is also often found in stored products with high insect populations [12], marine sediments [18], activated sludges [21], as a human opportunistic pathogen [7], and on leaves of plants [6, 17, 25, 30].

The common occurrence of *B. thuringiensis* on leaves has raised the question as to whether *B. thuringiensis* is a plant mutualist. Smith and Couche [29] proposed that as *B. thuringiensis* is part of the common leaf microflora of many plants, it has access to leaf-feeding insect larvae, and thereby, offers plants a degree of protection from phytophagous insect larvae [8]. Elliot et al. [10] have discussed this “bodyguard hypothesis”: namely, that the bacterium may be maintained on the phylloplane of the plant, perhaps from more stable reservoirs in the soil, where the plant could benefit from the killing of insects by the bacterium before they reach large numbers. It might be expected that as a mutualist of plants that *B. thuringiensis* might readily exploit leaves as a habitat to increase numbers to such an extent that it could expect to kill phytophagous insects, thereby, further increasing their numbers by exploiting the dead insect for growth.

The objective of the current study was to evaluate the capacity of different *B. thuringiensis* strains to colonize leaves under conditions optimized for growth of epiphytic bacteria. To gain further insight into the processes occurring on leaves during colonization, we also assessed the proportion of cells that were in a dormant spore form. By using a *gfp* marker gene we also assessed the spatial patterns of cell multiplication and associations with leaf structures by epifluorescence microscopy. The results all were consistent with a model that *B. thuringiensis* exhibits limited potential to grow on leaves but great ability to survive environmental stresses, most likely because the low nutrient levels in this habitat trigger sporulation before available nutrients can be exploited.

Materials and Methods

Bacterial Strains

Six *B. thuringiensis* strains (146-15702, 146-16807, 146-3804, 147-5406, *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* (Btk) HD1 and *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* biovar. *tenebrionis* (Btt)); and *Pseudomonas fluorescens* A506 [31] and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a [2] were used in this study. Strains 146-15702, 146-16807, 146-3804, and 147-5406 are Colombian strains isolated from leaves of *Piper sphaeroides* (146-15702 and 146-16807), *Erythrina japonica* (146-3804), and *Phaseolus vulgaris* (147-5406). The methods used for their isolation have been described previously [17], and some of these strains have been reported elsewhere [11, 17]. Strains Btk HD1 and Btt were obtained from the *Bacillus* Genetic Stock Center (Columbus, OH). Bacterial strains were grown in Luria–Bertani (LB) medium at 30°C (*B. thuringiensis*) or 27°C (*Pseudomonas* spp.) with agitation at 200 rpm for 24 h.

Plant Inoculations

Suspensions of 10^4 vegetative cells per milliliter of each bacterial strain in sterile distilled water were sprayed onto bean plants (*Phaseolus vulgaris* cv. Bush Blue Lake 274) (20 plants per strain) as in earlier studies [26]. One group of plants was inoculated with a mixture of Btt and *P. syringae* (10^4 cells/mL each). Plants were 10 days old and were kept in a greenhouse until inoculation. After inoculation, plants were placed in a humid chamber with a photoperiod of 14 h per day and a temperature of about 28°C with periodic wetting of leaves for 72 h (100% RH), conditions which have been shown to be optimal for bacterial growth [2]. The plants were then exposed to a drier environment (40% RH and 28°C) simulating a normal situation in nature.

Measurement of Bacterial Population Sizes on Leaves

At 2, 6, 12, 24, 71, 74, 78, 84, 96, and 144 h after inoculation, five individual leaves were excised from plants corresponding to each treatment, retaining as little petiole as possible. Leaves which showed no damage or defects were chosen randomly from among the inoculated plants. Leaves were placed individually in 50-mL tubes containing 20 mL of washing buffer [26], and the tubes were sonicated for 7 min and then vortexed for 20 s. This leaf washing solution was divided into two aliquots, and one was pre-treated at 80°C for 10 min to kill vegetative cells (except for the *Pseudomonas* spp. treatments). An aliquot of 50 μ l of each suspension was then plated on LB medium with a spiral diluter and plater (model D; Spiral Systems, Inc., Bethesda, MD) to estimate the total bacterial population size and onto 10% Kings Medium B containing 100 μ g/mL rifampicin to estimate *Pseudomonas* populations. The plates were incubated for 24 h at 30°C (*B. thuringiensis* strains) or 48 h at 27°C (*Pseudomonas* spp. strains), and the bacterial colonies were then counted. *B. thuringiensis* strains were readily differentiated from other resident bacteria by their rapid growth and large white dry colony morphology on LB. No bacteria resembling *B. thuringiensis* were detected on control plants not inoculated with this species. The experiments were repeated twice with very similar results. The results of one representative experiment are provided.

In Situ Observation of Bacterial Growth and Location

B. thuringiensis strains 146-15702, 146-16807, and Btk HD1 were transformed with plasmid pSB2019 [27], kindly provided by Dr. P. Hill (University of Nottingham). The relevant features of pSB2019 are: the presence of a trans-

lationally enhanced *gfp3* under control of P_{xyIA} , with the *xyIR* repressor removed to yield xylose-independent expression and two antibiotic resistance determinants (Ap^R , Cm^R). *B. thuringiensis* cells were prepared for electroporation by growing them at 30°C with agitation until an OD_{600} of about 0.5 (mid-exponential cells). Cells were then harvested by centrifugation, washed twice in ice-cold water, and resuspended in 1/500 of the original volume in cold water. Fifty microliters of cell suspension were mixed with 1 µg of plasmid DNA in a chilled 0.2-cm cuvette and were subjected to a single electroporation pulse (capacitance 25 µF, voltage 1.8 kV, resistance 200 Ω) using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad). Immediately after the pulse, 1 mL of SOC medium (Bacto tryptone 20 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 0.5 g, 10 mL of KCl 250 mM, 5 mL of $MgCl_2$ 2 mM, 10 mL of glucose 2 M, per liter) was added and the cell suspension transferred to a sterile tube and incubated at 30°C for 1 h before plating onto LB containing 10 mg/mL Cm, and incubated at 30°C for 24 h. The plates were kept at 4°C until use. The marker gene and plasmid pSB2019 was found in about 50% of the cells of all strains after growth for 20 generations, which suggested that minimal loss of the plasmid would be expected in the 3 days growth (about three or four generations) expected on leaves.

Bacteria were inoculated onto bean plants as above and after 24 and 48 h, three leaves were randomly selected and the upper leaf surfaces observed for the presence of *B. thuringiensis* as previously described [23, 24]. Samples were observed by epifluorescence microscopy using an Axiophot Zeiss microscope (Zeiss Inc., Oberkochen, Germany) [23, 24]. Images were captured with an Optronics DEI-750 video camera and transferred to a personal computer platform.

Nutrient-Dependent Growth of Bacteria *In Vitro*

The nutrient dependent growth of the successful epiphytic bacterium *P. fluorescens* strain A506 and *B. thuringiensis* HD1 were assessed after inoculation into culture media containing various concentrations of an equal mixture of casamino acids and yeast extract as a nutrient source. Inoculum of each strain was grown until mid-logarithmic growth stage (about 2×10^8 cells/mL) in minimal medium A containing 10 g/L casamino acids and then diluted directly into minimal medium A containing only either 1,000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 2, 1, or 0.5 mg of the casamino acids–yeast extract mixture/liter to yield an initial cell concentration of about 10^5 cells/mL in sterile virgin plastic culture tubes. Cultures were incubated with shaking at 28°C, and viable population sizes were assessed by plating of appropriate dilutions of the cultures onto 10% LB agar daily for 3 days.

Results

Measurement of Bacterial Population Sizes on Leaves

The population size of several different *B. thuringiensis* strains were measured after inoculation onto bean plants subsequently exposed to sequential wet and then dry conditions to assess both their ability to grow and survive on leaves (Fig. 1a–f). The population size of all *B. thuringiensis* strains increased from about 10^3 to 10^4 cfu/g of leaf shortly after inoculation to 1 to 5×10^5 cells/g within about 24 h after inoculation. While cell populations increased rapidly for about 24 h after inoculation, little further increase in population size was observed even under conditions of prolonged moisture (Fig. 1a–f). Upon the imposition of desiccation stress 72 h after inoculation, culturable *B. thuringiensis* populations decreased slightly but increased to populations similar to that attained before plant surfaces dried within 24 h (Fig. 1a–f). No substantial difference in population size of the different *B. thuringiensis* strains tested were noted at a given sample time (Fig. 1a–f).

In contrast to that of *B. thuringiensis*, the total population of other resident bacteria and of inoculated *P. fluorescens* strain A506 increased to much higher levels but were more responsive to desiccation stress. As in other studies [1, 2, 26], the population size of other contaminating culturable bacteria resident on greenhouse plants at the time of bacterial inoculation was only about 10^4 cells/g (Fig. 1a–f). The population size of these bacteria increased to over 10^7 cells/g, in most cases within 24 h after plants were incubated under humid conditions. Likewise, the population size of *P. fluorescens* strain A506 increased to over 10^7 cells/g within 72 h after inoculation (Fig. 1g). However, upon the imposition of desiccation stress, the population size of total resident bacteria and that of *P. fluorescens* strain A506 decreased over tenfold within 24 h and exhibited little subsequent increase during subsequent periods of incubation on dry leaves (Fig. 1g).

The use of a heat shock treatment allowed us to estimate the proportion of culturable *B. thuringiensis* cells recovered from plants that were in the form of heat-resistant spores (Fig. 1a–f). As the inoculum of *B. thuringiensis* strains was vegetative cells, it was not surprising that no spores were recovered from plants shortly after inoculation. However, after 24 h of incubation between 10^4 and 10^5 , *B. thuringiensis* spores/g were recovered from plants inoculated with these strains, and spores accounted for greater than 50% of the total cell population at many sampling times (Fig. 1a–f). No substantial difference in numbers of spores of the different *B. thuringiensis* strains tested were noted at a given sample time (Fig. 1a–f).

The population size of *P. syringae* strain B728a was similar on plants inoculated only with this strain and when

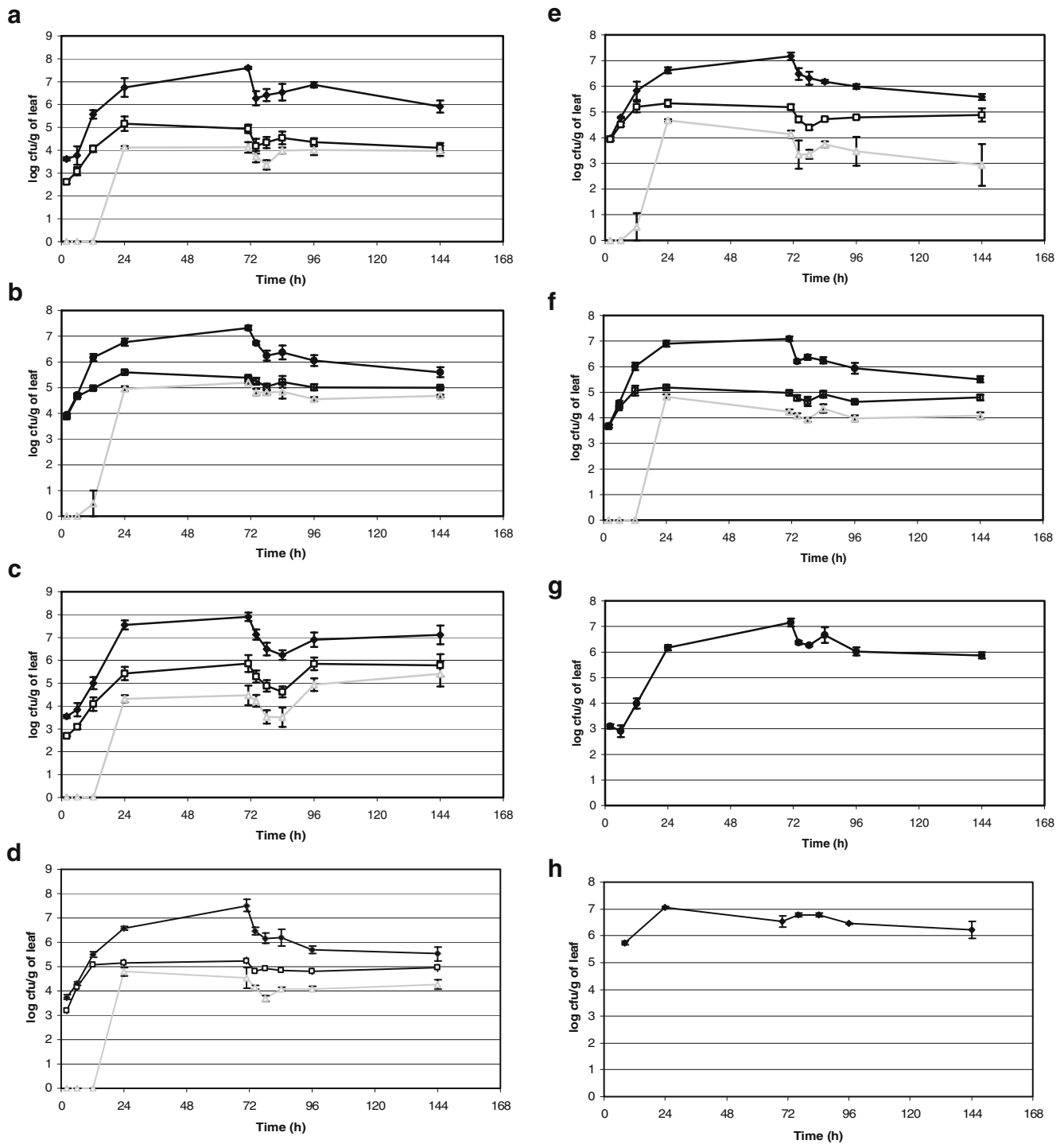


Figure 1 Epiphytic populations of (a) *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1; (b) *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* biovar. *tenebrionis*; (c) *B. thuringiensis* strain 146-15702; (d) *B. thuringiensis* strain 146-16807; (e) *B. thuringiensis* strain 146-3804; (f) *B. thuringiensis* strain 147-5406; (g) *Pseudomonas fluorescens* A506; and (h) *Pseudomonas syringae* pv *syringae* B728a, at various times

after inoculation. Total epiphytic bacteria (filled diamonds); total *B. thuringiensis* cells (empty squares); *B. thuringiensis* spores (empty triangles); *Pseudomonas fluorescens* population (filled circles). Plants were incubated for the first 72 h under humid conditions followed by a drier environment. Vertical bars indicate the standard error of the mean of log-transformed bacterial populations.

co-inoculated with Btt (compare Fig. 1h with Fig. 2). Likewise, the population of Btt was similar on plants inoculated only with this strain and on plants co inoculated with *P. syringae* (compare Fig. 1b with Fig. 2).

In Situ Observation of Bacterial Growth and Location

The spatial distribution and pattern of cell aggregation of *B. thuringiensis* strains 146-15702, 146-16807, and Btk HD1 harboring a *gfp* marker gene were assessed on bean plants 2 days after inoculation and incubation under humid conditions by epifluorescence microscopy. Consistent with the relatively low populations of culturable cells of *B. thuringiensis* recovered from plants, relatively few green fluorescent cells were observed on leaf surfaces. Cell abundance varied spatially across the leaf, but typically from 30 to about 100 cells per leaf segment of approximately 1 cm² could be visualized (Fig. 3). Thus, only a few cells were typically seen in a given microscope field.

B. thuringiensis cells did not form large cell aggregates, and cells were most commonly observed as solitary cells. Cell clusters of from 2 to about 10 cells were also observed but usually accounted for less than 20% of the cells observed on a given leaf. Cells were not obviously associated with any leaf structure such as stomata, trichomes, or veins. Spores could not be directly visualized due to the fact that the *gfp* marker gene was not expressed well in the spores.

Nutrient-Dependent Growth of Bacteria *In Vitro*

As all *B. thuringiensis* strains exhibited limited growth on leaves compared to other successful epiphytic bacteria such as *P. fluorescens*, we explored whether the poor growth was

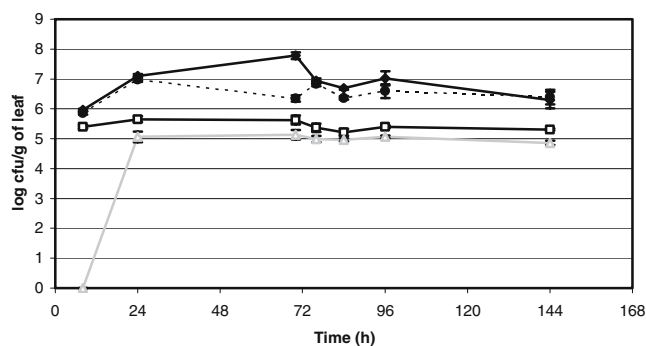


Figure 2 Population of bacteria after inoculation of bean plants with an equal mixture of *Bacillus thuringiensis* serovar. *morrisoni* biovar. *tenebrionis* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. Total epiphytic bacteria (filled diamonds); total *B. thuringiensis* cfu (empty squares); *B. thuringiensis* spores (empty triangles); *P. syringae* pv. *syringae* B728a population (filled circles). The plants were incubated under humid conditions (100% RH and 28°C) for the first 72 h and then were changed to a drier environment (40% RH and 28°C). Vertical bars indicate the standard errors of the determination of the mean of log-transformed population sizes.

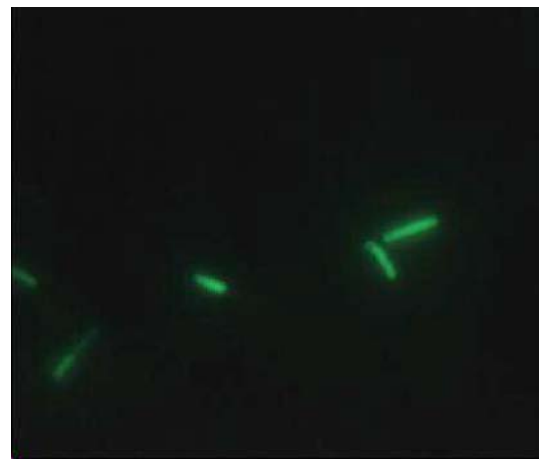


Figure 3 *Gfp* fluorescence exhibited by cells of *B. thuringiensis* 146-15702 (pSB2019) on a bean leaf visualized with epifluorescent microscopy 48 h after inoculation. (original magnification: ×1,000).

due to their inability to exploit the relatively low concentrations of nutrients expected on leaves. The nutrient-dependent growth of *P. fluorescens* strain A506 and *B. thuringiensis* HD1 were assessed by transferring actively growing cultures of these two species into culture media containing various concentrations of a mixture of casamino acids and yeast extract as a nutrient source. As expected, the number of viable cells recovered immediately after transfer to media of various nutrient concentrations was independent of the nutrient concentrations (Fig 4). The *B. thuringiensis* strain had only about a 10% plating efficiency on the 10% LB plates used to estimate population sizes. Maximum growth of all cultures was observed by 48 h incubation; no further increases were observed with longer incubation. By 48 h after inoculation, the population size of *P. fluorescens* had increased to levels above that initially inoculated in all cultures, irrespective of nutrient concentration. Population

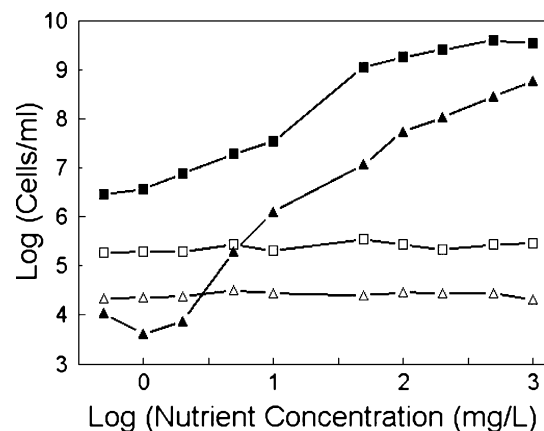


Figure 4 Maximum population sizes of *Pseudomonas fluorescens* strain A506 (squares) or *Bacillus thuringiensis* HD1 (triangles) attained in media containing various concentrations of carbon-containing nutrients. Population sizes measured immediately after inoculation (open symbols) and after 48 h growth at 28°C (filled symbols) are shown.

sizes generally increased proportionally with increasing nutrient concentration in the range of 0.5 to about 200 mg/L (Fig. 4). As about 10^7 cells can be produced from the consumption of most carbon sources [4], the final population sizes of *P. fluorescens* was close to that expected at a given nutrient concentration in this range. In contrast, no net increase in viable cell concentration was observed in *B. thuringiensis* cultures at nutrient concentrations less than about 5 mg/L (Fig. 4). Viable population sizes increased with increasing nutrient concentrations in a manner similar to that of *P. fluorescens* only at nutrient concentrations greater than about 10 mg/L (Fig. 4).

Discussion

While reports of the natural occurrence of *B. thuringiensis* on leaves in natural and agricultural settings have appeared [6, 17, 25, 30] detailed studies of its ability to colonize plant surfaces have not been previously done. Given that many bacterial species, even those not commonly observed on leaves such as *Salmonella* species [3, 5, 26], have been shown to have the potential to achieve relatively large population sizes on moist leaves, it was surprising that *B. thuringiensis* was such a poor colonist even under such conducive conditions. It has been proposed that the availability of carbon compounds is a major limiting factor for epiphytic bacterial populations [15, 20, 32]. Plant species having relatively low amounts of leaf surface nutrients support lower epiphytic populations than those with relatively high amounts of leaf exudates [20]. However, bean plants have been shown to both harbor relatively large amounts of leaf exudates and to support large epiphytic bacterial populations. Indeed, *P. fluorescens* strain A506 achieved population sizes that were over 100-fold higher than any *B. thuringiensis* strain in this study (Fig. 1). A mixture of resident bacteria on plants inoculated with *B. thuringiensis* also increased to populations of over 10^7 cells/g in this study, a level very similar to that of *P. fluorescens*, suggesting that this might be considered a carrying capacity for nutritionally robust bacteria on bean leaves (Fig. 1). It is possible that *B. thuringiensis* is simply a poor competitor for leaf surface nutrients compared to other epiphytic bacteria. However, several lines of evidence suggest that *B. thuringiensis* is unable to access nutrients that might be available on leaves. For example, all *B. thuringiensis* strains exhibited substantial sporulation after about 24 h after inoculation as vegetative cells to plants. At this time, populations of other epiphytic bacteria were still increasing rapidly suggesting that adequate nutrients for growth were still present. As a spore, *B. thuringiensis* would not be able to access such nutrients, and hence, its population size would be less than if it had not sporulated.

Direct evidence that *B. thuringiensis* was unable to grow at relatively low nutrient concentrations was obtained by comparing its growth at various nutrient concentrations with that of *P. fluorescens*, a successful epiphytic colonizer (Fig. 4). While *P. fluorescens* multiplied at nutrients levels as low as 0.5 mg/L, no net growth of *B. thuringiensis* was seen at concentrations less than about 5 mg/L (Fig. 4). While we did not examine these cultures for sporulation, it seems likely that the lack of growth of *B. thuringiensis* at low nutrient concentrations was due to its cessation of growth and sporulation at such low levels of nutrients. As the concentration of sugars, the dominant carbon-containing nutrient on bean leaves, is generally less than about 10 mg/L (assuming that the nutrients on a given leaf are suspended in a milliliter of water when leaves are moistened) [20], *B. thuringiensis* would not be expected to exhibit substantial growth on leaves given its inability to grow at similar concentrations of casamino acids in culture. *B. thuringiensis* might thus be considered a copiotroph, requiring relatively large concentrations of nutrients for optimum growth. Such a species, like the more commonly studied *Bacillus subtilis*, thus apparently transforms to inactive “shut-down” cells when the external environment is deprived [13], thereby, avoiding the stresses of a nutrient-limited environment, but missing opportunities to grow when low nutrient levels such as those on leaves are encountered. Such a lifestyle might be expected if *B. thuringiensis* was evolved to be primarily an insect pathogen. It might be expected that it might, at least transiently, encounter relatively high concentrations of nutrients when consuming an insect that it had killed via its production of Cry protein. It is possible that it might also transiently encounter sufficiently high nutrient concentrations in decaying vegetation in soil, etc. However, the results of this study suggest strongly that the levels of nutrients on leaves are not sufficient to enable substantial growth to occur. As the abundance of nutrients on leaves appears to be spatially variable, with abundant nutrients found only in relatively small portions of the leaf [15], only a small proportion of immigrant cells of *B. thuringiensis* might encounter sufficiently large nutrient concentrations to support growth and delay the nutrient-stress induction of sporulation. Such cells might be capable of a few rounds of cell division before nutrient levels fell to a point where sporulation was eventually induced. It is noteworthy that no large aggregates of *B. thuringiensis* cells were observed on bean leaves unlike those of *P. syringae* and *Erwinia herbicola* that have been described before [22]. In fact, the clusters of 2 to 10 *B. thuringiensis* cells that were observed might logically represent the results of one to four cell divisions of solitary immigrant cells from the inoculum. Large cell aggregates presumably form where localized sources of nutrients are sufficiently large or are continually replenished to enable the continued multiplication of

immigrant bacteria. Given that no such large aggregates of *B. thuringiensis* were observed, we infer that cells of this species could not exploit even such nutrient-rich sites on plants, unlike other bacterial species.

While *B. thuringiensis* exhibits less ability to multiply on plants than any other bacterium that has been examined, it has superior capabilities to survive on leaves than other epiphytic bacteria. When plants encounter a change in environment from humid to dry conditions, total epiphytic bacterial populations often declined between 10- and 100-fold [1, 2, 26]. In this study *P. fluorescens* strain A506 declined over 10-fold (Fig. 1). In other studies, *P. agglomerans* and *P. chlororaphis* populations, declined 43- and 32-fold, respectively, and *P. syringae* strains declined over 20-fold, after alternating wet and dry conditions [5]. In contrast, upon the imposition of desiccation stress culturable *B. thuringiensis* populations decreased only slightly and quickly regained populations similar to that attained before plant surfaces dried (Fig. 1). The stress tolerance of *B. thuringiensis* is probably due to the fact that a large proportion of its cells on a plant are in the form of stress-tolerant spores.

It is now recognized that *B. thuringiensis* strains produce lactonases that can hydrolyze *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs), involved in quorum sensing in other bacterial species, into inactive products [9, 14]. The co-inoculation of *B. thuringiensis* strains with the AHL-producing plant pathogen *Erwinia carotovora* decreased disease symptoms, apparently by blocking AHL-mediated quorum sensing required for virulence [9]. As the epiphytic fitness and virulence of *P. syringae* are apparently controlled by a quorum-sensing system that involves the production of 3-oxo hexanoyl homoserine lactone [28], and as such, bacterial species might both be expected to be present on leaves, we examined whether *B. thuringiensis* might be able to quench quorum sensing in *P. syringae*, thereby, affecting its epiphytic fitness. In this study, the growth and survival of *P. syringae* was not affected by the presence of *B. thuringiensis* and vice versa (Fig. 2). Given that the population size of *B. thuringiensis* was quite low relative to that of *P. syringae*, there might not have been enough AHL lactonase produced to affect the behavior of *P. syringae*. Alternatively, as *P. syringae* cells are mostly found in segregated aggregates on leaves, the populations of *B. thuringiensis* and *P. syringae* might not have been sufficiently coincident for AHL degradation to have occurred.

The results of these studies suggest that *B. thuringiensis* does not exist primarily as a plant mutualist. *B. thuringiensis* does not appear to exhibit physiological variability in the context of growth on plants. The several *B. thuringiensis* strains examined, which included commercialized insect pathogens and strains isolated from the foliage of plants, exhibited remarkably similar behaviors when inoculated onto bean plants (Fig. 1). It might have been expected that if

B. thuringiensis existed primarily in a mutualistic relationship with plants, the strains recovered from plants would exhibit a greater epiphytic fitness than those that had been selected as the most insecticidal. The fact that commercialized insecticidal strains such as Btk HD1 and Btt did not differ in either the maximum populations achieved on plants or their ability to survive stresses on plants suggests that *B. thuringiensis* strains do not differ in epiphytic fitness and that there has not been selection for such traits. It seems most likely that the populations of *B. thuringiensis* that are observed on plants are not due primarily to multiplication in this habitat, but instead, also are due in a significant part, to processes such as immigration from other habitats. Immigration has been shown to be a major factor in the accumulation of epiphytic bacteria on plants such as citrus on which bacteria of all kinds appear unable to exhibit much growth [16]. Thus, if we assume that *B. thuringiensis* can achieve high numbers in certain habitats such as in infected insects, then its relatively low population sizes on plants (10^2 to 10^3 cells/g) might be accounted for in large part to immigration from such sources. In an earlier study, we showed that *B. thuringiensis* cells could immigrate to upper leaves of plants from soil (Maduell et al., submitted). The rapid formation of spores that are apparently highly tolerant of stresses encountered on leaves (Fig. 1) also would contribute to the accumulation of an epiphytic population of *B. thuringiensis*.

Acknowledgements This study was supported by CODI of the Universidad de Antioquia (IN506CE). We thank Renee Koutsoukis for valuable technical help throughout the study. We also thank Denise Schichnes and Cesar Poza for assistance in performing epifluorescence microscopy.

References

1. Beattie, GA, Lindow, SE (1994a) Comparison of the behavior of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* under controlled and field conditions. *Appl Environ Microbiol* 60(10): 3799–3808
2. Beattie, GA, Lindow, SE (1994b) Survival, growth, and localization of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* on leaves. *Appl Environ Microbiol* 60(10): 3790–3798
3. Brandl, MT, Haxo, AF, Bates, AH, Mandrell, RE (2004) Comparison of survival of *Campylobacter jejuni* in the phyllosphere with that in the rhizosphere of spinach and radish plants. *Appl Environ Microbiol* 70(2): 1182–1189
4. Brandl, MT, Lindow, SE (1998) Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* 64(9): 3256–3263
5. Brandl, MT, Mandrell, RE (2002) Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 68(7): 3614–3621
6. Collier, FA, Elliot, SL, Ellis, RJ (2005) Spatial variation in *Bacillus thuringiensis/cereus* populations within the phyllosphere

- of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius*) and surrounding habitats. FEMS Microbiol Ecol 54(3):417–425
7. Damgaard, PH, Granum, PE, Bresciani, J, Torregrossa, MV, Eilenberg, J, Valentino, L (1997) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. FEMS Immunol Med Microbiol 18(1): 47–53
 8. Damgaard, PH, Hansen, BM, Pedersen, JC, Eilenberg, J (1997) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. J Appl Microbiol 82(2): 253–258
 9. Dong, YH, Gusti, AR, Zhang, Q, Xu, JL, Zhang, LH (2002) Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. Appl Environ Microbiol 68(4): 1754–1759
 10. Elliot, SL, Sabelis, MW, Janssen, A, van der Geest, LPS, Beerling, EAM, Fransen, J (2000) Can plants use entomopathogens as bodyguards? Ecol Lett 3(3): 228–235
 11. Jara, S, Maduell, P, Orduz, S (2006) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. J Appl Microbiol 101(1): 117–124
 12. Kaelin, P, Gadani, F (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. Curr Microbiol 40(3): 205–209
 13. Koch, AL (2001) Oligotrophs versus copiotrophs. Bioessays 23 (7): 657–661
 14. Lee, SJ, Park, SY, Lee, JJ, Yum, DY, Koo, BT, Lee, JK (2002) Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol 68(8): 3919–3924
 15. Leveau, JH, Lindow, SE (2001) Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. Proc Natl Acad Sci USA 98(6): 3446–3453
 16. Lindow, SE, Andersen, GL (1996) Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. Appl Environ Microbiol 62(8): 2978–2987
 17. Maduell, P, Callejas, R, Cabrera, KR, Armengol, G, Orduz, S (2002) Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of Piper (Piperaceae) in three altitudinal levels. Microb Ecol 44(2): 144–153
 18. Maeda, M, Mizuki, E, Nakamura, Y, Hatano, T, Ohba, M (2000) Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. Curr Microbiol 40(6): 418–422
 19. Martin, PA, Travers, RS (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol 55(10): 2437–2442
 20. Mercier, J, Lindow, SE (2000) Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. Appl Environ Microbiol 66(1): 369–374
 21. Mizuki, E, Maeda, M, Tanaka, R, Lee, DW, Hara, M, Akao, T, Yamashita, S, Kim, HS, Ichimatsu, T, Ohba, M (2001) *Bacillus thuringiensis*: a common member of microflora in activated sludges of a sewage treatment plant. Curr Microbiol 42(6): 422–425
 22. Monier, JM, Lindow, SE (2004) Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. Appl Environ Microbiol 70(1): 346–355
 23. Monier, JM, Lindow, SE (2005) Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. Microb Ecol 49(3): 343–352
 24. Monier, JM, Lindow, SE (2005) Spatial organization of dual-species bacterial aggregates on leaf surfaces. Appl Environ Microbiol 71(9): 5484–5493
 25. Nair, JR, Singh, G, Sekar, V (2002) Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity. J Appl Microbiol 93(5): 772–780
 26. O'Brien, RD, Lindow, SE (1989) Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. Phytopathology 79: 619–627
 27. Qazi, SN, Rees, CE, Mellits, KH, Hill, PJ (2001) Development of gfp vectors for expression in *Listeria monocytogenes* and other low G+C Gram positive bacteria. Microb Ecol 41(4): 301–309
 28. Quinones, B, Dulla, G, Lindow, SE (2005) Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. Mol Plant Microbe Interact 18(7): 682–693
 29. Smith, RA, Couche, GA (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Appl Environ Microbiol 57(1): 311–315
 30. Uribe, D, Martinez, W, Ceron, J (2003) Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. J Invertebr Pathol 82 (2): 119–127
 31. Wilson, M, Lindow, SE (1993) Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. Phytopathology 83: 117–123
 32. Wilson, M, Lindow, SE (1994) Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. Appl Environ Microbiol 60(12): 4468–4477

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Distribución y caracterización de *B. thuringiensis* en el filoplano de especies de *Piper* (*Piperaceae*) en tres estratos altitudinales (Artículo I)

4.1.1. Recolección, transporte y procesamiento de las muestras

En tres muestreos (10/9/1999, 4/2/2000 y 26/5/2000), en las horas de la mañana, se recolectaron hojas de 35 plantas pertenecientes a 13 especies de la familia *Piperaceae* (*Piper aduncum* L., *P. artanthe* C. DC., *P. calcerolarium* C. DC., *P. crassinervium* H. B. K., *P. danielgonzalezii* Trel., *P. glanduligerum* C. DC., *P. holtonii* C. DC., *P. imperiale* C. DC., *P. marequitense* H. B. K., *P. montanum* C. DC., *P. oroense* Trel. & Yun., *P. otophorum* C. DC. y *P. sphaeroides* C. DC.). Ejemplares de cada muestra fueron adicionalmente recolectados y depositados en el herbario de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

El muestreo se realizó en el denominado altiplano de Santa Rosa de Osos, en los municipios de Bello, San Pedro y Medellín, sobre la Cordillera Central Colombiana, entre 1800 m y 2900 msnm, aproximadamente en las coordenadas: 6° 21' 30'' N, 75° 38' 30'' W. La zona de muestreo comprende las zonas de vida bosque húmedo premontano y bosque muy húmedo premontano, con precipitaciones anuales promedio entre 1000 (partes más bajas) y 4000 (partes más altas) mm y con temperaturas anuales promedio entre 16 y 24°C. Esta zona se dividió en tres estratos altitudinales: bajo (1800-1950 msnm), medio (1960-2300 msnm) y alto (2310-2900 msnm). En la Tabla 1 se muestra la distribución de las muestras recogidas en los tres estratos altitudinales.

Tabla 1. Distribución y número de muestras de hoja, ordenadas por especie de *Piper* y el estrato altitudinal en el que fueron colectadas en la cordillera andina central en Colombia.

Especie	Estrato altitudinal		
	Bajo (1800-1950 m)	Medio (1960-2300 m)	Alto (2310-2900 m)
<i>P. aduncum</i>		1	
<i>P. artanthe</i>			3
<i>P. calcerolarium</i>	2	3	1
<i>P. crassinervium</i>	2	2	1
<i>P. daniel-gonzalezii</i>	1	1	1
<i>P. glanduligerun</i>	3	1	
<i>P. holtonii</i>		1	
<i>P. imperiale</i>	1		
<i>P. marequitense</i>		1	
<i>P. montanum</i>		1	2
<i>P. otophorum</i>	1		
<i>P. scobinifolium</i>		1	1
<i>P. sphaeroides</i>	2	1	1
Total	12	13	10

De cada planta muestreada se colectaron un mínimo de 4 hojas (dependiendo del tamaño de la hoja de cada especie). Se seleccionaron hojas que no fueran muy jóvenes, que no estuvieran contaminadas con suelo y que no les afectara la luz directa del sol. Las hojas se guardaron en bolsas plásticas estériles de cierre hermético y se transportaron en hielo hasta el laboratorio, donde fueron cortadas en secciones cuadradas de entre 0,5 y 1 cm² hasta sumar un área total de 120 cm² y se almacenaron en 15 ml de LB con 20% glicerol a -20°C hasta su análisis.

4.1.2. Aislamiento de *B. thuringiensis*

Se utilizó la técnica descrita por Smith y Couche (1991) con las siguientes modificaciones. Los frascos con las muestras se descongelaron, se agitaron en vórtex por 1 min y se recuperó el líquido. Se centrifugó 15 min a 5000 rpm, y el sedimento se resuspendió en 1 ml de agua estéril. Se volvió a centrifugar 5 min a 12500 rpm y el pellet se resuspendió en 200 µl de agua estéril. Se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en placas de Petri con medio nutritivo LB. A las 48 h se observaron las

placas y se aislaron las colonias que tenían morfología compatible con *B. thuringiensis*. Dichas colonias fueron incubadas en medio líquido de esporulación M1 (30°C, 250 rpm) (Orduz *et al.*, 1996). A las 24 h se observaron las colonias seleccionadas en el microscopio de contraste de fase. Las que presentaban cristal paraesporal se identificaron como *B. thuringiensis* y se almacenaron a –20°C para su posterior análisis. A la solución de endosporas más cristales se la denominó cultivo completo final (CCF). Se estimó la población real de endosporas y/o células viables por unidad de área, a partir de las unidades formadoras de colonias (cfu) de las dos diluciones más altas a las que se había aislado *B. thuringiensis*.

También se cultivaron en medio M1 las cepas tipo de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*, *B. thuringiensis* serovar. *aizawai*, *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*, *B. thuringiensis* serovar. *medellin*, *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* patovar. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*, *B. thuringiensis* serovar. *galleriae* y *B. thuringiensis* serovar. *tolworthi*, obtenidas de la colección de microorganismos de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, para ser utilizadas como controles en la caracterización de los aislamientos.

4.1.3. Extracción de DNA y análisis de PCR

Se sembraron todas las cepas en placas de Petri con medio nutritivo LB. A las 18 h se recogieron las células con una asa de siembra y se resuspendieron en 200 µl de agua estéril. Las suspensiones celulares se colocaron a –20°C durante dos horas, e inmediatamente se pasaron a un baño María a 100°C durante 10 minutos para lisar las células. Se centrifugaron 45 s a 12500 rpm y se recuperaron los sobrenadantes que

contenían el DNA total (Ceron *et al.*, 1995). Este se guardó a -20°C para posteriores análisis.

Se usaron los cebadores generales *gral-cry1*, *Col*, *Dip* y *gral-cry11* para detectar la presencia de genes *cry1*, *cry3*, *cry4* y *cry11*, respectivamente (Carozzi *et al.*, 1991; Bravo *et al.*, 1998). También se usaron los grupos de cebadores *CJ1-7*, *CJ8-13* y *CJ14-19* para detectar la presencia de genes específicos *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*; *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*; y *cry1E*, *cry1F*, *cry9A*, respectivamente) (Ceron *et al.*, 1994; Ceron *et al.*, 1995). Las características de los cebadores están detalladas en la Tabla 2. La metodología utilizada fue ligeramente modificada de los protocolos publicados. Las mezclas de PCR contenían: tampón de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 8,8), 2,5 mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 0,2-0,4 μM de cada primer, 0,5-2 μl *Taq*-polimerasa, 1-2,5 μl de DNA, y se completó el volumen hasta 25 μl con H_2O estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización de 5 min a 94°C , 35 ciclos (para los cebadores generales) y 40 ciclos (para los específicos) de: desnaturalización 45 s a 94°C , hibridación 45 s a 49°C (para *gral-cry1*), 46°C (*Col*), 52°C (*Dip*), 45°C (*gral-cry11*), 48°C (*CJ1-7* y *CJ8-13*), o 49°C (*CJ14-19*), y extensión 1 min a 72°C ; finalmente se hizo un paso extra de extensión de 6-10 min a 72°C . Después de la amplificación, las muestras se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1% (para los cebadores generales) y al 2% (para los específicos) a 100 V durante 45 min (cebadores generales y *CJ14-19*) y 70 min (cebadores *CJ1-7* y *CJ8-13*). Se usaron como controles positivos *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* y *B. thuringiensis* serovar. *aizawai* (para *gral-cry1*, *CJ1-7* y *CJ8-13*), *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* patovar. *tenebrionis* (para *Col*), *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* (para *Dip*), *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* y *B. thuringiensis*

serovar. *medellin* (para gral-cry11) y *B. thuringiensis* serovar. *darmstadiensis*, *B. thuringiensis* serovar. *galleriae* y *B. thuringiensis* serovar. *tolworthi* (para CJ14-19).

Tabla 2: Características de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia	Gen reconocido	Nucleótidos
Lep1A	5'CCGGTGTGGATTGTGTTA3'	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac</i>	310-330
Lep1B	5'AATCCCGTATTGTACCAGCG3'		780-800
Lep2A	5'CCGAGAAAAGTCAAACATGCG3'	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac</i>	2158-2178
Lep2B	5'TACATGCCCTTTCACGTTCC3'		3046-3066
Dip1A	5'CAAGCCGCAAATCTGTGGA3'	<i>cry4A, cry4B</i>	2551-2571
Dip1B	5'ATGGCTTGTTTCGCTACATC3'		3328-3348
Dip2A	5'GGTGTCTCCTATTCTTTGGC3'	<i>cry4A</i>	740-760
Dip2B	5'TGACCAGGTCCTTGATTAC3'		2010-2030
Col1A	5'GTCCGCTGTATATTCAGGTG3'	<i>cry3A</i>	1801-1821
Col1B	5'CACTTAATCCTGTGACGCCT3'		2430-2450
Col2A	5'AGGTGCCAACTAACCATGTT3'	<i>cry3A, cry3B</i>	621-641
Col2B	5'GATCCTATGCTTGGTCTAGT3'		1661-1681
CJ1	5'TTATACTTGGTTCAGGCC3'	<i>cry1Aa, cry1Ad</i>	1105-1125
CJ2	5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA3'		1332-1351
CJ3	5'CAGCCGATTTACCTTCTA3'	<i>cry1Ad</i>	1181-1198
CJ2	5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA3'		1332-1351
CJ4	5'AACAACATCTGTCTTGAC3'	<i>cry1Ab, cry1Ac</i>	1133-1153
CJ5	5'CTCTTATTATACTTACACTAC3'		1328-1348
CJ6	5'GTTAGATTAATAAGTAGTGG3'	<i>cry1Ac</i>	1495-1514
CJ7	5'TGTAGCTGGTACTGTATTG3'		1656-1674
CJ8	5'CTTCATCACGATGGAGTAA3'	<i>cry1B</i>	1007-1025
CJ9	5'CATAATTTGGTCGTCTGTT3'		1355-1374
CJ10	5'AAAGATCTGGAACACCTT3'	<i>cry1C</i>	1306-1325
CJ11	5'CAAACCTAAATCCTTTCAC3'		1416-1436
CJ12	5'CTGCAGCAAGCTATCAA3'	<i>cry1D</i>	837-856
CJ13	5'ATTTGAATTGTCAAGGCCTG3'		1107-1127
CJ14	5'GGAACCAAGACGAACTATTGC3'	<i>cry1Ea</i>	1029-1050
CJ15	5'GGTTGAATGAACCCTACTCCC3'		1154-1175
CJ14	5'GGAACCAAGACGAACTATTGC3'	<i>cry1Eb</i>	1026-1047
CJ15	5'GGTTGAATGAACCCTACTCCC3'		1151-1172
CJ16	5'TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC3'	<i>cry1F</i>	813-834
CJ17	5'CGGTTACCAGCCGTATTTCG3'		969-989
CJ16	5'TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC3'	<i>cry1Fa</i>	1290-1311
CJ17	5'CGGTTACCAGCCGTATTTCG3'		1446-1466
CJ16	5'TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC3'	<i>cry1Fb</i>	1295-1316
CJ17	5'CGGTTACCAGCCGTATTTCG3'		1451-1471
CJ18	5'ATATGGAGTGAATAGGGCG3'	<i>cry1G</i>	1778-1797
CJ19	5'TGAACGGCGATTACATGC3'		1994-2012
gral-cry1	5'CTGGATTTACAGGTGGGGATAT3' 5'TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT3'	<i>cry1Aa, cry1Ad</i>	1472-2029
		<i>cry1Ab, cry1Ae</i>	1475-2032
		<i>cry1Ac</i>	1472-2035
		<i>cry1Af</i>	1636-2194
		<i>cry1Ba</i>	1559-2116
		<i>cry1Bb</i>	1577-2131
		<i>cry1Bc</i>	2181-2723
		<i>cry1Ca</i>	1463-2056
		<i>cry1Cb</i>	1463-2017
		<i>cry1Da, cry1Db</i>	1442-1984
		<i>cry1Ea, cry1Fa</i>	1454-2011
		<i>cry1Eb</i>	1451-2005
		<i>cry1Fb</i>	1936-2490
		<i>cry1G</i>	1430-1987
		<i>cry1Ha</i>	1457-2005
<i>cry1Hb</i>	2181-2723		
<i>cry1Ia, cry1Ib</i>	1583-2140		
<i>cry1Ja</i>	1439-1993		
<i>cry1Jb</i>	1615-2172		
<i>cry1K</i>	2012-2569		
gral-cry11	5'TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC3' 5'CATTGTACTTGAAGTTGTAATCCC3'	<i>cry1IA</i>	1553-1857
		<i>cry1IB</i>	1588-1892

4.1.4. Bioensayos

Se analizó la toxicidad de todos los CCF de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas contra larvas de primer instar de *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera, Noctuidae*). Se colocaron por duplicado 400 µl de CCF en vasos plásticos (de 3 cm de diámetro) con dieta artificial (Shorey y Hale, 1965), se dejó secar, se colocaron cinco larvas neonatas de *S. frugiperda* y se llevó a 30°C. Se observó la mortalidad de las larvas a las 72 horas. A las cepas de *B. thuringiensis* que resultaron ser tóxicas, se les calculó el rango de toxicidad utilizando diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-5}) de CCF. Se usaron como control positivo: *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* y *B. thuringiensis* serovar. *aizawai*.

También se analizaron los CCF de las colonias aisladas contra larvas de tercer instar de *Culex quinquefasciatus* (*Diptera, Culicidae*). Se colocaron por duplicado 100 µl de CCF en vasos plásticos que contenían 100 ml de agua, con 10 larvas de *C. quinquefasciatus* y se llevó a 30°C. Se observó la mortalidad de las larvas a las 24 horas. A las cepas tóxicas también se les calculó el rango de toxicidad con las mismas diluciones seriadas de CCF. Se usó como control positivo *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*.

4.1.5. Análisis estadístico

Se realizó un primer estudio para evaluar diferencias en cuanto al número de aislamientos de *B. thuringiensis* entre los tres estratos altitudinales y las diferentes especies de *Piper*. En este estudio se definió como unidad experimental cada una de las muestras de hojas y se tomó como variable dependiente el número de células viables y/o endosporas de *B. thuringiensis* por cm² de hoja. Las variables independientes que se analizaron fueron: el rango altitudinal en el que se encontraba la muestra y la especie vegetal.

En un segundo estudio se pretendían detectar diferencias en cuanto a las características de los aislamientos de *B. thuringiensis* encontrados en los tres estratos altitudinales y en las diferentes especies vegetales. En este caso, el estudio se realizó en dos fases: una primera en la que se consideró como unidad experimental cada una de las muestras vegetales y una segunda en la que se consideró como unidad experimental cada uno de los aislamientos de *B. thuringiensis*. En ambos casos se tomaron como variables dependientes el número de células y/o endosporas viables de *B. thuringiensis* que presentaban: cristal redondo, cristal bipiramidal, toxicidad para *S. frugiperda*, toxicidad para *C. quinquefasciatus*, presencia de genes *cry1*, presencia de genes *cry4*, y presencia de genes *cry11*. En la primera fase de este estudio, el valor de las variables fue el porcentaje de células viables que presentaban dicha característica en cada muestra vegetal; mientras que en la segunda fase se trabajó con valores absolutos. Las variables independientes utilizadas en las dos fases fueron las mismas que en el primer estudio. Se analizaron los resultados obtenidos mediante métodos de análisis de la varianza (ANOVA) con el programa Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.).

4.2. Diversidad de cepas de *B. thuringiensis* en el filoplano de maíz y fríjol y en sus respectivos suelos en Colombia (Artículo II)

4.2.1. Recolección de las muestras

Se recolectaron muestras de hojas y suelos de cultivos de maíz y fríjol en tres municipios (Marinilla, El Santuario y Carmen de Viboral) ubicados en el oriente del Departamento de Antioquia, Colombia. Los municipios se encuentran a una altura

aproximada de 2150 msnm, con una temperatura promedio de 17°C, una precipitación anual de 2500 a 2800 mm, y zonas de vida similares (Espinal, 1992). De cada municipio se estudiaron cuatro fincas con cultivos de maíz y cuatro con cultivos de frijol. Ninguna de las fincas muestreadas había sido previamente tratada con formulaciones de *B. thuringiensis*. De cada finca se recolectaron hojas de cuatro plantas. Las hojas se recolectaron de la parte media de las plantas, a una altura de 1,50 m aproximadamente. La edad promedio de las plantas de maíz en cultivo fue de 5 meses, mientras que la edad de las plantas de frijol fue de 4 meses. Adicionalmente se realizó un muestreo de los suelos de cada planta a 5 cm de profundidad; se hizo una mezcla de suelos por cada finca, con el fin de establecer si existía algún tipo de relación entre los aislamientos obtenidos del filoplano y de los suelos respectivos. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas estériles y selladas para ser transportadas al laboratorio en hielo.

4.2.2. Aislamiento de *B. thuringiensis*

Para el aislamiento de *B. thuringiensis* de la superficie de las hojas, se siguió la técnica anteriormente descrita, con la diferencia de que la suspensión de células lavadas de la hoja se dividió en dos alícuotas, y a una de ellas se le aplicó un tratamiento de calor para matar las células vegetativas (80°C 10 min).

De las mezclas de suelos de cada finca se pesaron 0,5 g y se suspendieron en 10 ml de medio líquido LB, se agitaron en vórtex durante 1 min, se tomó una alícuota de 2 ml de la suspensión resultante y se sometió a choque térmico (80°C durante 10 min). Después se realizaron diluciones, de las que se sembraron 100 µl en medio LB y se incubaron a 30°C por 24 h. Con cada colonia presuntiva de ser *B. thuringiensis* se prosiguió de manera similar que para la recuperación de *B. thuringiensis* en las hojas.

4.2.3. Determinación de genes *cry* por PCR

Para la extracción del DNA se siguió la técnica descrita anteriormente. Para la identificación de la presencia de los genes *cry* se utilizaron los cebadores Lep, Col, Dip, gral-cry11 y los grupos de cebadores CJ1-7, CJ8-13 y CJ14-19 (Carozzi *et al.*, 1991; Ceron *et al.*, 1994; Ceron *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 1998) (Tabla 2), utilizando las condiciones que se han descrito previamente.

4.2.4. Determinación de las proteínas del cristal

Se obtuvieron 5 ml de CCF en medio M1, se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min a 4°C, luego se resuspendieron en NaCl 1 M y se incubaron durante 1 h a 250 rpm a 30°C. Posteriormente, se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min a 4°C, el sedimento se lavó 3 veces con agua destilada fría con fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 10 mM y se centrifugó a las mismas condiciones. Las toxinas Cry se solubilizaron en medio alcalino con 100 µl de NaOH 50 mM, se incubaron durante 1 h a 250 rpm a 30°C, y se centrifugaron para recuperar en el sobrenadante las proteínas Cry. La determinación de la concentración de proteínas solubilizadas se realizó por el método de Bradford (1976). La composición del cristal de los aislamientos que presentaron mayor actividad tóxica se examinó por SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989); dichos aislamientos también se analizaron por *Western blot* utilizando antisuero policlonal producido en ratón contra las proteínas del cristal de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*, *medellin* e *israelensis* (Segura *et al.*, 2000). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y se reveló con 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato y nitroazul tetrazolium.

4.2.5. Bioensayos

La actividad biológica de los aislamientos de *B. thuringiensis* se evaluó con larvas de tercer instar de *C. quinquefasciatus* y con larvas neonatas de *S. frugiperda* tal y como se ha descrito anteriormente.

A los aislamientos que presentaron más del 95% de mortalidad en los bioensayos preliminares, se les determinó el rango de toxicidad, haciendo diluciones seriadas del CCF con PBS estéril y se llevó a cabo nuevamente el procedimiento de bioensayo ya descrito con *C. quinquefasciatus* y *S. frugiperda*. A aquellos aislamientos que presentaron toxicidad hasta altas diluciones se les determinó la CL₅₀ y la DL₅₀ mediante nuevos bioensayos en los que se usó la misma metodología con concentraciones decrecientes de proteínas. Los cálculos se realizaron con la ayuda del programa estadístico Probit diseñado por Raymond (1985).

4.2.6. Análisis estadístico

Se realizó un estudio de ANOVA para evaluar diferencias en cuanto al número de aislamientos de *B. thuringiensis* entre los tres municipios, las dos especies evaluadas y el origen de las muestras, suelo u hoja. También se buscaron diferencias en cuanto a las características de los aislamientos de *B. thuringiensis* encontrados en los tres municipios, las dos especies evaluadas y un origen diferente, suelo u hoja. Se analizaron los resultados obtenidos mediante métodos de ANOVA. En todos los análisis se utilizó el programa Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.).

4.3. Migración de *B. thuringiensis* a hojas de fríjol desde el suelo o desde hojas distantes (Artículo III)

4.3.1. Selección de cepas

Se usaron dos cepas de *B. thuringiensis* (146-15702 y 146-16807) que habían sido aisladas de hojas de plantas del género *Piper* previamente (Maduell *et al.*, 2002). La cepa 146-15702 contiene genes *cry4* y *cry11*, cristal paraesporal de morfología redonda, y es tóxica para *C. quinquefasciatus*. La cepa 146-16807 contiene los genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc* y *cryIB*, cristal paraesporal de morfología bipiramidal, y es tóxica para *S. frugiperda*.

4.3.2. Transformación de cepas

Para poder recuperar más fácilmente las cepas de las hojas, se les introdujo, mediante transformación, marcadores de resistencia a antibióticos. La cepa 146-15702 se transformó con el plásmido pHT315, cedido por el Dr. Didier Lereclus (Instituto Pasteur) y la cepa 146-16807 se transformó con el plásmido pSV2, cedido por el Dr. Neil Crickmore (Universidad de Sussex). El plásmido pHT315 es resistente a ampicilina y eritromicina y el plásmido pSV2 es resistente a ampicilina y cloramfenicol. Ambos se obtuvieron de cepas recombinantes de *Escherichia coli* usando el kit de Promega *Wizard® Plus Minipreps DNA purification system* de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Las células de *B. thuringiensis* se prepararon para la electroporación creciéndolas a 30°C, a 250 rpm, hasta obtener una DO₆₀₀ de 0,5. Las células fueron centrifugadas y lavadas en agua fría (4°C) dos veces, y finalmente fueron resuspendidas en 1/500 del volumen original en agua fría. Cincuenta microlitros de células se mezclaron con 1 µg del plásmido en una

cubeta fría de 0,2 cm, y se sometieron a un único pulso de electroporación (capacitancia 25 μ F, voltaje 1,8 kV, resistencia 200 Ω) usando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Inmediatamente después del pulso, se añadió a la cubeta 1 ml de medio SOC (Bacto triptona 20 g, Extracto de levadura 5 g, NaCl 0,5 g, 10 ml de KCl 250 mM, 5 ml de MgCl₂ 2 mM, 10 ml de Glucosa 2 M, por litro) y la suspensión resultante fue transferida a un tubo estéril e incubada a 30°C durante 1 h. Posteriormente las células se sembraron en medio LB con los antibióticos de resistencia correspondientes. Las concentraciones de antibióticos utilizadas fueron: eritromicina 25 μ g/ml y cloramfenicol 10 μ g/ml.

4.3.3. Inoculación y toma de muestras

Las cepas transformadas de *B. thuringiensis* se crecieron en LB con antibióticos hasta obtener una DO₆₀₀ de 0,8, lo que daba una concentración de aproximadamente 10⁸ cfu/ml.

Se realizaron 4 tratamientos para cada una de las cepas más el control negativo, siendo los tratamientos impares para la cepa 146-15702 pHT315 y los pares para la cepa 146-16807 pSV2. En los tratamientos 1 y 2 se esterilizó el suelo mediante un proceso de autoclave (20 min/120°C) y éste fue inoculado con *B. thuringiensis* para obtener una concentración final aproximada de 10⁶ cfu/g de suelo; al día siguiente se sembraron semillas de fríjol. En los tratamientos 3 y 4 se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior pero con suelo natural. En los tratamientos 5 y 6 se sumergieron semillas de fríjol en cultivos de *B. thuringiensis* de 10⁸ cfu/ml, las cuales se sembraron en suelo natural. En los tratamientos 7 y 8 se sembraron semillas de fríjol en suelo natural y se esperó 10 días a que las plantas germinaran y entonces se inocularon las hojas por

aspersión con *B. thuringiensis*. Un grupo de plantas fue tratado igual que el resto pero nunca fue inoculado con *B. thuringiensis*. Este grupo fue considerado como control.

En todos los tratamientos las semillas de frijol fueron esterilizadas previamente (agua destilada 30 s, alcohol 70% 1 min, agua estéril 30 s, hipoclorito sódico (5000 ppm) 1 min, agua estéril 30 s, agua estéril 30 s). Las plantas se mantuvieron en invernadero (temperatura media 21°C, 77% de humedad relativa media) hasta la toma de muestras.

Cada uno de los tratamientos estaba formado por 5 macetas con 5 semillas por maceta; los diferentes tratamientos fueron colocados separadamente para evitar la contaminación cruzada.

4.3.4. Recuperación de *B. thuringiensis*

Seis o siete días después de plantar las semillas las plantas empezaron a brotar. Siete días después las plantas alcanzaron un tamaño suficiente como para poder coleccionar hojas maduras. A los 14, 21 y 28 días de la siembra (tratamientos 1-6 y control) o a los 21, 28 y 35 (tratamientos 7 y 8) se tomaron 4 muestras de hojas sanas por tratamiento. Las hojas se coleccionaron del tercio superior de las plantas. Se utilizaron tijeras y pinzas estériles para cortar y colocar las muestras en bolsas estériles, las cuales fueron llevadas al laboratorio y analizadas inmediatamente.

Además, a los 10 y a los 18 días de la siembra se tomaron 4 muestras de suelo por tratamiento en los tratamientos 3 y 4. En cada caso se tomaron 5 g de suelo a una profundidad de unos 5 cm. Se utilizó una espátula estéril para colocar las muestras en bolsas estériles, las cuales fueron llevadas al laboratorio y analizadas inmediatamente.

Para aislar *B. thuringiensis* de las muestras de hoja, se utilizó la técnica descrita previamente en el apartado 3.1.2. (Maduell *et al.*, 2002) pero obviando el paso de congelación ya que las muestras se analizaron inmediatamente después de ser colectadas. De cada muestra de suelo, se tomaron 0,5 g de suelo y se suspendieron en 5 ml de agua estéril. A partir de este punto, todas las muestras (suelos y hojas) siguieron el mismo proceso. Se realizaron diluciones seriadas y se tomaron dos submuestras; una de ellas pasó por un tratamiento de choque térmico (80°C durante 10 min) para seleccionar los aislamientos en forma de endospora. Después de este proceso, las diluciones fueron sembradas en placas de LB con eritromicina 25 µg/ml (para la cepa 146-15702 pHT315) o cloramfenicol 10 µg/ml (para la cepa 146-16807 pSV2). La otra serie de muestras fue sembrada directamente en placas de LB con los antibióticos respectivos, para recuperar las endosporas y/o células viables. A las 48 h se observaron las placas y se aislaron las colonias que tenían morfología compatible con *B. thuringiensis*. Dichas colonias fueron incubadas en medio líquido de esporulación M1 con antibiótico. A las 24 h se observaron las colonias seleccionadas en el microscopio de contraste de fase. Las que presentaban cristal parasporal se identificaron como *B. thuringiensis* y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Además, se estimó la población real de endosporas y/o células viables por unidad de área (hojas) o de peso (suelos), a partir de las cfu de las dos diluciones más altas en las que se había aislado *B. thuringiensis*.

Se buscó si existían diferencias en el número de cfu/cm² de hoja entre tratamientos, entre cepas y entre días de muestreo, mediante métodos de ANOVA con el programa Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.).

4.3.5. Caracterización de los aislamientos

Para confirmar que los aislamientos recuperados correspondían a las cepas inoculadas se realizaron unas PCR. Se usaron los cebadores generales *gral-cry1* y *gral-cry11* (Bravo *et al.*, 1998) para detectar la presencia de genes *cry1* y *cry11*, respectivamente, según se ha descrito anteriormente.

4.4. Determinación de la capacidad de *B. thuringiensis* de colonizar la superficie de las hojas (Artículo IV)

4.4.1. Selección de cepas

En este estudio se utilizaron seis cepas de *B. thuringiensis* (146-15702, 146-16807, 146-3804, 147-5406, *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 y *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* biovar. *tenebrionis*), *Pseudomonas fluorescens* A506 (Wilson y Lindow, 1993) y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Beattie y Lindow, 1994b). Las cepas 146-15702, 146-16807, 146-3804, y 147-5406 son aislamientos colombianos aislados de hojas de *Piper sphaeroides* (146-15702 y 146-16807), *Erybotria japonica* (146-3804), y *Phaseolus vulgaris* (147-5406). En el apartado 3.1.2. se describe la metodología usada para su aislamiento (Maduell *et al.*, 2002) y alguna de estas cepas ya se habían reportado previamente (Maduell *et al.*, 2002; Maduell *et al.*, 2006). Las cepas *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 y *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* biovar.

tenebrionis se obtuvieron del *Bacillus* Genetic Stock Center (Columbus, OH, USA). Las cepas se crecieron en medio LB a 30°C (*B. thuringiensis*) o 27°C (*Pseudomonas* spp.) en agitación a 200 rpm durante 24 h.

4.4.2. Inoculación de las plantas

Una suspensión en agua estéril de 10^4 células vegetativas por ml de cada una de las cepas fue aplicada mediante un spray en plantas de frijol (20 plantas por cepa), utilizando la técnica descrita por O'Brien y Lindow (1989). Además, un grupo de plantas fue inoculado con una mezcla de *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* biovar. *tenebrionis* y *P. syringae* (10^4 células/ml de cada una). Las plantas utilizadas tenían 10 días y fueron mantenidas en invernadero hasta la inoculación, momento en el que fueron colocadas en cámaras húmedas, con un fotoperiodo de 14 h de luz, una temperatura de 28°C y una humedad relativa del 100% durante 72 h; condiciones que han sido descritas como óptimas para el crecimiento bacteriano (Beattie y Lindow, 1994b). Posteriormente las plantas fueron sometidas a un ambiente seco durante 72 h (40% RH y 28°C), simulando una situación normal de la naturaleza.

4.4.3. Medición de la población bacteriana en la hoja

A las 2, 6, 12, 24, 71, 74, 78, 84, 96 y 144 h después de haber inoculado, se tomaron 5 muestras de cada tratamiento; las muestras correspondían a hojas sanas recolectadas por el pecíolo aleatoriamente. Las hojas se colocaron individualmente en tubos de 50 ml que contenían 20 ml de una solución de lavado (O'Brien y Lindow, 1989), fueron inmediatamente sonicadas durante 7 min y se les aplicó vórtex durante 20 s. La solución resultante fue dividida en dos alícuotas y una de ellas fue sometida a un choque de calor de 80°C durante 10 min para matar las células vegetativas (excepto en los tratamientos

con *Pseudomonas* spp.). Cincuenta microlitros de cada suspensión fueron sembrados en medio LB mediante un sembrador en espiral (modelo D; Spiral Systems, Inc., Bethesda, MD) para estimar la población total de bacterias. Las placas fueron incubadas durante 24 h a 30°C (*B. thuringiensis*) o 48 h a 27°C (*Pseudomonas* spp.), y se contaron las colonias. Las colonias de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* se consiguieron diferenciar fácilmente de las colonias de las bacterias residentes de las hojas, gracias a su rápido crecimiento y su morfología diferencial en LB. En las plantas control no se recuperaron colonias con la morfología de *B. thuringiensis*. El experimento se repitió dos veces, obteniéndose resultados muy similares.

4.4.4. Observación *in situ* de *B. thuringiensis*, localización y crecimiento

Las cepas 146-15702, 146-16807 y HD1 de *B. thuringiensis* se transformaron con el plásmido pSB2019 (Qazi *et al.*, 2001), cedido por el Dr. P. Hill (Universidad de Nottingham). Este plásmido permite la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) y confiere resistencia a ampicilina y cloramfenicol.

Las células de *B. thuringiensis* se prepararon para la electroporación tal y como se ha descrito previamente. La GFP siguió expresándose en aproximadamente el 50% de las células después de crecer al menos 20 generaciones en LB sin antibióticos, lo que sugiere que existió una pérdida mínima del plásmido en las células inoculadas en las hojas.

Se inocularon las cepas transformadas sobre plantas de frijón, y 24 y 48 h después se tomaron hojas para su observación al microscopio tal y como se había descrito anteriormente (Monier y Lindow, 2005a, 2005b). Las muestras se observaron mediante

microscopía de epifluorescencia en un microscopio Axiophot (Zeiss Inc., Oberkochen, Alemania) (Monier y Lindow, 2005a, 2005b). Las imágenes fueron capturadas con una cámara de video Optronics DEI-750 y transferidas a formato digital.

4.5. Capacidad de *B. thuringiensis* de crecer *in vitro* en medios que simulan el medio ambiente de la hoja (Artículos III y IV)

4.5.1. Crecimiento de bacterias epífitas

Se usaron las cepas de *B. thuringiensis* 146-15702 y 146-16807, y la cepa comercial de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1. Además se seleccionaron 10 aislamientos de bacterias epífitas, aislados de hojas de fríjol de cultivos de la región de Antioquia, Colombia, siguiendo el procedimiento ya descrito en el apartado 3.1.2. (Maduell *et al.*, 2002). Estos aislamientos fueron identificados mediante el sistema Biolog (Biolog, Inc., Hayward CA) como: *B. mycoides*, *B. amyloliquefasciens*, *B. licheniformis* (aislamientos F23 y F29), *B. subtilis*, *Pseudomonas syringae* pv *sesami*, *P. viridiflava* (aislamientos F4 y F12), *P. syringae* pv *syringae*, y *P. syringae* pv *zizante*.

Se recogió una asada de células después de haber crecido estos 13 aislamientos en placas de LB, y se resuspendieron en 200 µl de agua estéril. Se tomaron 10 µl de cada suspensión y se colocaron en el centro de una placa de LB y otros 10 µl en una placa de BDM, medio diseñado para simular la composición de nutrientes del filoplano (Lindow, 1988). A las 24, 48, 120 y 168 h se midió el crecimiento en mm de la colonia resultante. Se hicieron tres réplicas por cepa y medio de cultivo.

Se buscó si existían diferencias en el crecimiento de las diferentes cepas a lo largo del tiempo en los dos medios, mediante métodos de ANOVA con el programa Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.).

4.5.2. Crecimiento bacteriano dependiente de nutrientes

También se midió el crecimiento dependiente de nutrientes de *P. fluorescens* cepa A506 (especie habitante natural de hojas) y *B. thuringiensis* HD1, inoculando las cepas en medios de cultivo con una concentración de casaminoácidos decreciente. Se crecieron las cepas hasta la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 2×10^8 células/ml) en un medio mínimo A (10 g/l casaminoácidos), y posteriormente se transfirieron las células a un nuevo medio A pero esta vez con 1000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 2, 1, ó 0,5 mg casaminoácidos/l, obteniéndose una concentración de entre 10^4 y 10^5 células/ml. Los cultivos fueron incubados a 200 rpm a 28°C y a las 24, 48 y 72 h se sembraron en medio 10% de LB para contar las poblaciones resultantes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Distribución y caracterización de *B. thuringiensis* en el filoplano de especies de *Piper* (*Piperaceae*) en tres estratos altitudinales (Artículo I)

En este estudio se recolectaron 35 muestras de hojas de 13 especies del género *Piper* (*Piperaceae*) en tres estratos altitudinales en la Cordillera Central colombiana. *B. thuringiensis* fue encontrado en 26 de las muestras analizadas (74%). Se obtuvieron aislamientos de *B. thuringiensis* de todas las especies vegetales estudiadas y de los tres niveles altitudinales muestreados (Tablas 3 y 4). Esto confirmaba los resultados de estudios previos, en los que se había visto que *B. thuringiensis* es una bacteria que se encuentra naturalmente en este ambiente (Smith y Couche, 1991; Ohba, 1996; Damgaard *et al.*, 1997b; Damgaard *et al.*, 1998; Rizali *et al.*, 1998; Mizuki *et al.*, 1999). La presencia de *B. thuringiensis* en un porcentaje muy alto de muestras, comparado con otros trabajos (Ohba, 1996; Damgaard *et al.*, 1997b; Mizuki *et al.*, 1999), puede ser debido a la ausencia de estaciones en el trópico, sin cambios prolongados de las condiciones ambientales, lo que favorece la estabilidad de la microbiota bacteriana.

Tabla 3. Distribución de los aislamientos de *B. thuringiensis* de diferentes especies de *Piper* en tres estratos altitudinales en la cordillera andina central en Colombia.

Estratos altitudinales	Plantas con <i>B. thuringiensis</i> / total (%)	Aislamientos de <i>B. thuringiensis</i> por planta (SD)	Población estimada de <i>B. thuringiensis</i> por cm ² (SD) ^a
Bajo	7 / 12 (58,3)	7,5 (10,5)	1940 (3232)
Medio	11 / 13 (84,6)	10,5 (13,1)	5422 (16522)
Alto	8 / 10 (80)	3 (4,1)	1204 (3176)
Total	26 / 35 (74,3)	7,3 (10,5)	3023 (10295)

^a Estimación de la población de endosporas y/o células viables por unidad de área, calculada a partir de las cfu de las dos diluciones más altas con presencia de *B. thuringiensis*.

Tabla 4. Distribución de los aislamientos de *B. thuringiensis* en diferentes especies de *Piper* muestreadas en la cordillera andina central en Colombia.

Especie	Plantas con <i>B. thuringiensis</i> / total (%)	Aislamientos de <i>B. thuringiensis</i> por planta (SD)	Población estimada de <i>B. thuringiensis</i> por cm ² (SD) ^a
<i>P. aduncum</i>	1 / 1 (100)	2 (-)	0,06 (-)
<i>P. artanthe</i>	2 / 3 (66,6)	0,66 (0,6)	0,02 (0,02)
<i>P. calcerolarium</i>	4 / 6 (66,6)	10 (17,2)	624 (1490)
<i>P. crassinervium</i>	4 / 5 (80)	10,2 (14,3)	1073 (2289)
<i>P. daniel-gonzalezii</i>	3 / 3 (100)	10,6 (11,9)	3476 (5665)
<i>P. glanduligerun</i>	2 / 4 (50)	7,25 (9,5)	2294 (3788)
<i>P. holtonii</i>	1 / 1 (100)	1 (-)	0,03 (-)
<i>P. imperiale</i>	1 / 1 (100)	7 (-)	216 (-)
<i>P. marequitense</i>	1 / 1 (100)	18 (-)	60000 (-)
<i>P. montanum</i>	2 / 3 (66,6)	1 (1)	668 (940)
<i>P. scobinifolium</i>	2 / 2 (100)	6 (7)	1,8 (2,5)
<i>P. otophorum</i>	0 / 1 (0)	0 (-)	0 (-)
<i>P. sphaeroides</i>	3 / 4 (75)	9,75 (8,4)	4458 (4351)
Total	26 / 35 (74,3)	7,3 (10,5)	3023 (10294)

^a Estimación de la población de endosporas y/o células viables por unidad de área, calculada a partir de las cfu de las dos diluciones más altas con presencia de *B. thuringiensis*.

En las tablas 5 y 6 se muestran las características de los aislamientos obtenidos. De los 256 aislamientos realizados, 140 (55%) mostraron un cristal bipiramidal, 108 (42%) un cristal redondo, tres (1%) un cristal con morfología amorfa y cinco (2%) presentaron más de un cristal (generalmente redondos y/o bipiramidales).

Tabla 5. Caracterización de los aislamientos de *B. thuringiensis* según los estratos altitudinales, por morfología del cristal (bipiramidal, redondo u otros), presencia de genes *cry* y toxicidad contra *S. frugiperda* y *C. quinquefasciatus*

Estrato	Morfología del cristal (%)			Genotipo ^a (%)			Toxicidad (%)	
	Bipi.	Red.	Otros	<i>cry1</i>	<i>cry4</i>	<i>cry11</i>	<i>Spodoptera</i> ^b	<i>Culex</i> ^c
Bajo	77	17	7	97	0	3	93	6
Medio	38	63	0	48	0	63	34	66
Alto	67	33	0	87	26	33	67	33
Total	55	42	3	70	3	39	58	41

^a Ningún aislamiento amplificó genes *cry3* o *cry9*.
^b *Spodoptera frugiperda*
^c *Culex quinquefasciatus*

Tabla 6. Caracterización de los aislamientos de *B. thuringiensis* según las especies de *Piper*, por morfología del cristal (bipiramidal, redondo u otros), presencia de genes *cry* y toxicidad contra *S. frugiperda* y *C. quinquefasciatus*

Especie	Morfología del cristal (%)			Genotipo ^a (%)			Toxicidad (%)	
	Bipi.	Red.	Otros	<i>cryI</i>	<i>cry4</i>	<i>cryII</i>	<i>Spodoptera</i> ^b	<i>Culex</i> ^c
<i>P. aduncum</i>	0	0	100	100	0	0	100	0
<i>P. artanthe</i>	0	100	0	0	50	100	0	100
<i>P. calcerolarium</i>	75	25	0	93	0	23	75	25
<i>P. crassinervium</i>	92	8	0	98	0	0	94	8
<i>P. daniel-gonzalezii</i>	12	88	0	22	0	84	12	88
<i>P. glanduligerun</i>	31	69	0	45	0	69	31	69
<i>P. holtonii</i>	0	100	0	100	0	0	0	0
<i>P. imperiale</i>	100	0	0	100	0	0	100	0
<i>P. marequitense</i>	0	100	0	17	0	100	0	100
<i>P. montanum</i>	100	0	0	100	0	0	100	0
<i>P. scobinifolium</i>	8	92	0	8	0	92	8	92
<i>P. otophorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. sphaeroides</i>	41	44	15	92	18	18	80	18
Total	55	42	3	70	3	39	58	41

^a Ningún aislamiento amplificó genes *cry3* o *cry9*.
^b *Spodoptera frugiperda*
^c *Culex quinquefasciatus*

Ciento sesenta y un aislamientos (63%) amplificaron alguno de los genes *cryI* evaluados, mientras que en 20 aislamientos (8%) y, a pesar de haber mostrado un producto de PCR con los cebadores generales *cryI*, no se pudo determinar qué gen específico *cryI* contenían. Es probable que estos aislamientos presentaran algún otro gen *cryI* (*cryIG*, *cryIH*, *cryII*, *cryIJ*, *cryIK* o *cryIL*) que no se detecta con los cebadores utilizados, o también podrían presentar algún gen *cryI* nuevo. Noventa y nueve aislamientos (39%) amplificaron genes *cryII*, siete aislamientos (3%) amplificaron genes *cry4* y ningún aislamiento amplificó genes *cry3* o *cry9*. Finalmente, dos aislamientos no amplificaron ninguno de los genes evaluados (*cryI*, *cry3*, *cry4*, *cry9*, y *cryII*).

Se encontraron aislamientos que contenían de uno a cinco diferentes genes *cry*. Esta gran variabilidad llevó a encontrar 15 combinaciones diferentes de genes *cry*

(genotipos) (Tabla 7). Varias muestras de hojas tenían aislamientos de *B. thuringiensis* con hasta 6 genotipos *cry* diferentes. El genotipo *cry* más abundante (54,7% del total) fue *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIAd* y *cryIB*. Además 20 aislamientos (8%) presentaron los genes *cryI* y *cryII*, y cinco aislamientos los genes *cryI*, *cry4* y *cryII*. Esta fue la primera vez que se reportaron juntos genes *cryI* con genes *cryII* y *cry4*.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas de *B. thuringiensis* aislado de diferentes especies de *Piper*

Número de aislamientos	Genotipos	Porcentaje
140	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIAc</i> , <i>cryIAd</i> , <i>cryIB</i>	54,7
73	<i>cryII</i>	28,5
13	<i>cryI</i> (específicos no reconocidos) ^a , <i>cryII</i>	5,1
5	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIAc</i> , <i>cryIAd</i> , <i>cryIB</i> , <i>cryID</i>	2,0
5	<i>cryI</i> (específicos no reconocidos) ^a	2,0
3	<i>cryIAa</i> , <i>cryII</i>	1,2
2	<i>cryIAd</i> , <i>cry4</i> , <i>cryII</i>	0,8
2	<i>cryI</i> (específicos no reconocidos) ^a , <i>cry4</i> , <i>cryII</i>	0,8
2	<i>cry4</i> , <i>cryII</i>	0,8
2	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAd</i> , <i>cryII</i>	0,8
2	<i>cryIAd</i> , <i>cryII</i>	0,8
2	<i>cryIAa</i> , <i>cryIB</i>	0,8
1	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAd</i>	0,4
1	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIAc</i> , <i>cryIAd</i>	0,4
1	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAd</i> , <i>cry4</i> , <i>cryII</i>	0,4
2	Sin amplificación de ningún gen	0,8

^a Muestras que fueron positivas para los cebadores *gral-cryI* y negativas para los cebadores CJ1-7, CJ8-13 y CJ14-19.

En la mayoría de los casos, los genotipos complejos eran combinaciones de los genotipos simples. Se ha observado que la transferencia de plásmidos, donde están codificados los genes *cry*, entre diferentes cepas de *B. thuringiensis* puede ocurrir en ambientes naturales (Thomas *et al.*, 2000, 2001). Por esto no sería sorprendente pensar que los genotipos más complejos encontrados en el presente estudio fueran resultado de procesos de conjugación entre diferentes células de *B. thuringiensis*. Si esto fuera cierto se confirmaría que *B. thuringiensis* puede encontrarse de forma vegetativa en la superficie de las hojas de forma natural.

En los bioensayos se encontró que casi el 60% de cepas fueron tóxicas contra *S. frugiperda*, siendo 5 de ellas tan tóxicas como *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*, cepa ampliamente usada a nivel comercial. Por otro lado, algo más del 40% fueron tóxicas contra *C. quinquefasciatus*, 11 de ellas con una toxicidad igual o superior a *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. Un aislamiento fue tóxico contra las dos especies de insectos evaluados, y dos aislamientos no mostraron toxicidad contra *S. frugiperda* o *C. quinquefasciatus*. La elevada cantidad de cepas que presentaron toxicidad (99%) contrasta con los datos reportados en otros trabajos: el 90% de las 186 cepas que encontró Ohba (1996) no fueron tóxicas contra *Bombyx mori* ni contra *Aedes aegypti*; y el 76% de las 120 cepas que aislaron Mizuki *et al.* (1999) no fueron tóxicas contra *C. pipiens*, *Anopheles stephensi*, o *Plutella xylostella*. Por otro lado Bernhard *et al.* (1997) observaron que el 48,8% de 5000 aislamientos de *B. thuringiensis* recolectados de muestras de todo el mundo no eran tóxicas contra un amplio grupo de insectos. Es probable que estas diferencias sean debidas a las distintas especies de insectos evaluadas, o a la diversidad de genotipos de *B. thuringiensis* en el presente estudio, quizás debida a la elevada diversidad biológica presente en los trópicos.

La presencia de genes *cryI* estaba altamente asociada con cristales de morfología bipiramidal y con toxicidad contra lepidópteros, al mismo tiempo la presencia de genes *cry4* y *cry11* estaba altamente asociada con cristales de morfología redonda y con toxicidad contra dípteros. Este resultado confirma los reportados por Carozzi *et al.* (1991) y Lereclus *et al.* (1993), pero contrasta con lo reportado por Ohba (1996) y Kim (2000), en cuyos trabajos no encontraban esta asociación.

B. thuringiensis fue encontrado en todos los estratos altitudinales y en todas las especies vegetales muestreadas (menos una). El estudio estadístico mostró que no existían diferencias significativas en cuanto al número de aislamientos de *B. thuringiensis* en los diferentes estratos y en las diferentes especies evaluadas. Honguy *et al.* (2000) encontraron un mayor número de aislamientos de *B. thuringiensis* en almacenes de zonas montañosas que en zonas llanas (a menor altura). Con los datos absolutos que mostraban en ese trabajo, es difícil concluir si la altura tiene algún efecto en la distribución de *B. thuringiensis*, porque no se puede estimar la población real que había en las muestras estudiadas.

En cuanto a las características de los aislamientos de *B. thuringiensis* (cristal redondo, cristal bipiramidal, toxicidad para *S. frugiperda*, toxicidad para *C. quinquefasciatus*, presencia de genes *cryI*, *cry4* y *cryII*), no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes especies vegetales, pero sí entre los estratos altitudinales. Los aislamientos con cristales redondos y tóxicos contra *C. quinquefasciatus* fueron significativamente más abundantes en el estrato medio que en los otros estratos. Se debería hacer un estudio detallado de la distribución de especies de dípteros en este estrato altitudinal, y su relación con este género de plantas para poder determinar si existe algún factor que pueda explicar esta diferencia.

5.2. Diversidad de cepas de *B. thuringiensis* en el filoplano de maíz y fríjol y en sus respectivos suelos en Colombia (Artículo II)

Se aisló *B. thuringiensis* del filoplano y del suelo de cultivos de maíz y fríjol de tres municipios del Departamento de Antioquia, Colombia. Se analizaron 96 muestras de

hojas y 24 de suelos. Se encontró *B. thuringiensis* en el 51% de las muestras de filoplano y en el 33% de las muestras de suelo analizadas (Tabla 8). Se obtuvieron valores bajos en el número de células de *B. thuringiensis* en las hojas de maíz y de fríjol (0,46 y 1,5 endosporas / cm² de media, respectivamente); en cambio, se encontraron 42 y 316 endosporas por gramo de suelo de los campos de maíz y de fríjol, respectivamente. Estos valores fueron inferiores a lo reportado en otros trabajos tanto para hojas (Smith y Couche, 1991; Artículo I (Maduell *et al.*, 2002)) como para suelos (Damgaard 2000).

Tabla 8. Distribución y frecuencia de aislamientos de *B. thuringiensis* (Bt) de hojas y suelos de maíz y fríjol de tres municipios colombianos.

	Hoja			Suelo			Total
	Maíz	Fríjol	Subtotal	Maíz	Fríjol	Subtotal	
Nº de muestras con Bt (%)	27 (65)	22 (46)	49 (51)	3 (25)	5 (42)	8 (33)	57 (47)
Nº aislamientos de Bt	59 ^a , 76 ^b	61 ^a , 18 ^b	120 ^a , 94 ^b	10	49	59	273

^a Con choque térmico (10 min, 80°C), ^b Sin choque térmico.

No se encontraron diferencias significativas entre las especies estudiadas (maíz y fríjol) con respecto al número de aislamientos encontrados.

En las distintas cepas de *B. thuringiensis* aisladas, se encontraron dos tipos de morfología del cristal. En el filoplano predominaron las cepas con cristales bipiramidales (73%) tanto en maíz como en fríjol, mientras que en el suelo la mayoría de los aislamientos mostró cristal redondo (88%), especialmente en el suelo de fríjol (Tabla 9).

Tabla 9. Caracterización de aislamientos de *B. thuringiensis* de hojas de maíz y fríjol y de suelos de tres municipios colombianos.

Fuente	Nº de muestras	Nº de aislamientos	Morfología del cristal		Presencia de genes ^a			Toxicidad		
			Bipi. ^b	Red. ^c	<i>cry1</i>	<i>cry4</i>	<i>cry11</i>	<i>Spodop.</i> ^d	<i>Culex</i> ^e	No tóxicas
Hoja	96	214	158	59	146	4	59	141	59	17
Maíz	48	135	92	43	80	4	43	76	43	16
Fríjol	48	82	66	16	66	0	16	65	16	1
Suelo	24	59	7	52	7	0	52	7	52	0
Maíz	12	10	6	4	6	0	4	6	4	0
Fríjol	12	49	1	48	1	0	48	1	48	0
Total	120	273	165	111	153	4	111	148	111	17

^a Ningún aislamiento amplificó con cebadores para genes *cry3* o *cry9*.
^b Bipiramidal
^c Redonda
^d *Spodoptera frugiperda*
^e *Culex quinquefasciatus*

El gen *cry* predominante en los aislamientos del filoplano fue del tipo *cry1*, similar a lo encontrado en el Artículo I (Maduell *et al.*, 2002), seguido por el gen *cry11* (Tabla 9). En el suelo predominó el gen *cry11*, a diferencia de lo reportado por Bravo *et al.* (1998), quienes encontraron predominio del gen *cry1* seguido por el gen *cry3* y luego el gen *cry11* en el suelo. En el presente estudio, no se encontraron aislamientos con el gen *cry3* (ni en suelos ni en hojas), al igual que en los trabajos de Chak *et al.* (1994), Ben-Dov *et al.* (1997) y en el Artículo I (Maduell *et al.*, 2002), lo que confirma la baja frecuencia en la naturaleza de este gen importante en el control de plagas.

El genotipo predominante en el filoplano fue *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1D* (41%) (Tabla 10). En muestras de hoja, un genotipo parecido ya se había encontrado como más predominante en el Artículo I (Maduell *et al.*, 2002): *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*. Por otro lado, en los aislamientos provenientes del suelo, el genotipo predominante fue *cry11* (88%). Ningún aislamiento presentó los genes *cry1Ad*, *cry1E*, *cry1F*, o *cry9A*. Además 12 aislamientos, provenientes del filoplano, no presentaron productos de amplificación con ninguno de los cebadores utilizados. Es importante

anotar que se encontró una combinación de los genes *cry1B* y *cry1I* en 13 aislamientos, todos provenientes de las hojas de maíz, aunque 6 de ellos provenían de la misma planta; todos ellos fueron tóxicos para lepidópteros y no para dípteros. Esta combinación de genes *cry1* y *cry1I* no es muy frecuente, pero ya había sido reportada en el Artículo I (Maduell *et al.*, 2002).

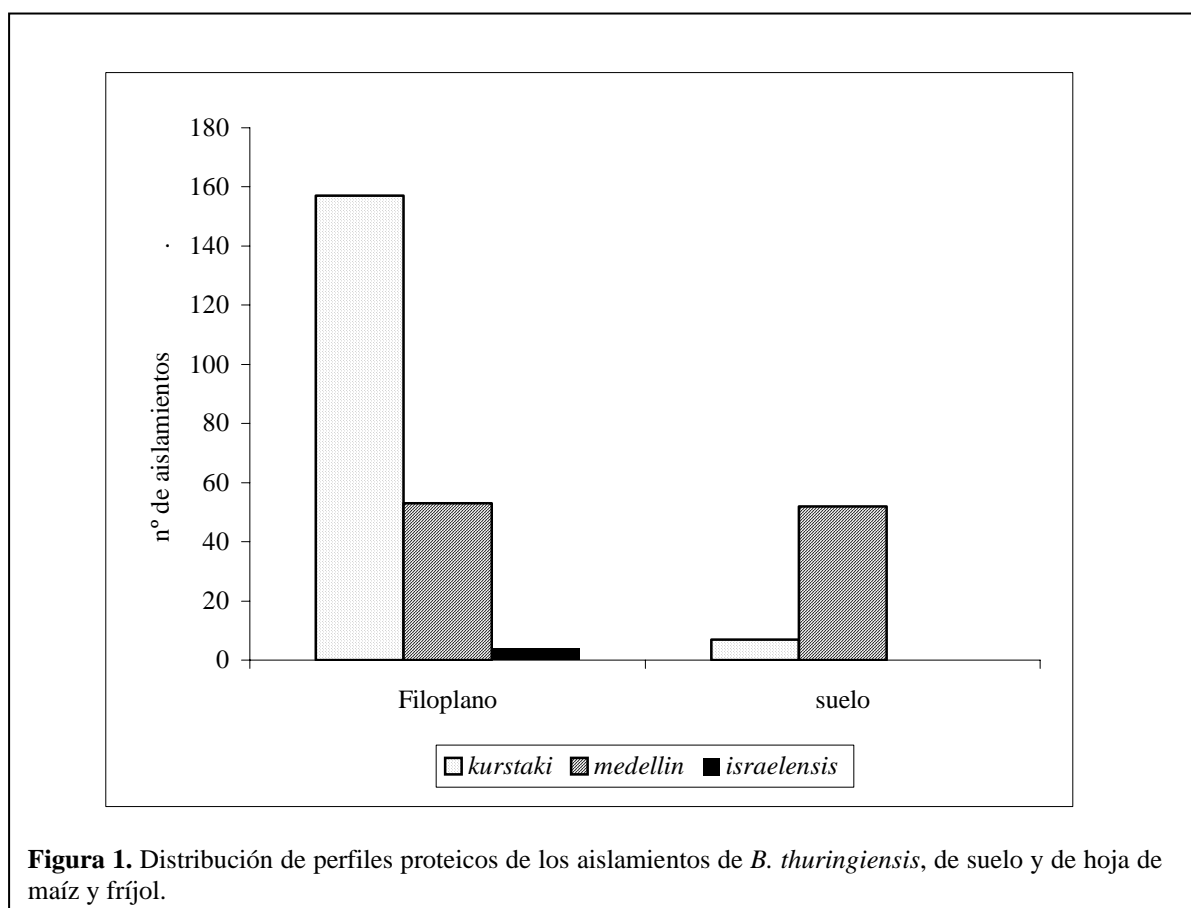
Tabla 10. Frecuencias genotípicas de los aislamientos de *B. thuringiensis* de suelos y hojas de maíz y fríjol de tres municipios colombianos.

Genotipo	Hoja			Suelo			Total (%)
	Maíz	Fríjol	Total (%)	Maíz	Fríjol	Total (%)	
<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry1D</i>	14	9	23 (10,7)	5	1	6 (10)	29 (10,6)
<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B</i>	2	0	2 (0,93)	1	0	1(2)	3 (1,0)
<i>cry1Aa, cry1Ac, cry1B, cry1D</i>	49	39	88 (41,1)				88 (32,2)
<i>cry1Aa, cry1Ac, cry1B</i>	10	16	26 (12,1)				26 (9,5)
<i>cry1Aa, cry1Ac, cry1D</i>	2	1	3 (1,4)				3 (1,0)
<i>cry1B, cry1C, cry1D</i>	1	0	1 (0,5)				1 (0,36)
<i>cry1B, cry1I</i>	13	0	13 (6,0)				13 (4,7)
<i>cry1B</i>	2	0	2 (0,93)				2 (0,73)
<i>cry3</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>cry4, cry1I</i>	4	0	4 (1,9)	0	0	0	4 (1,5)
<i>cry1I</i>	26	14	40 (18,6)	4	48	52 (88)	92 (33,6)
Sin amplificación ^a	12	0	12 (6,0)				12 (4,0)
Total	135	79	214 (100)	10	49	59 (100)	273 (100)

^a Cepas que no amplificaron ninguno de los genes evaluados (*cry1*, *cry3*, *cry4* y *cry1I*).

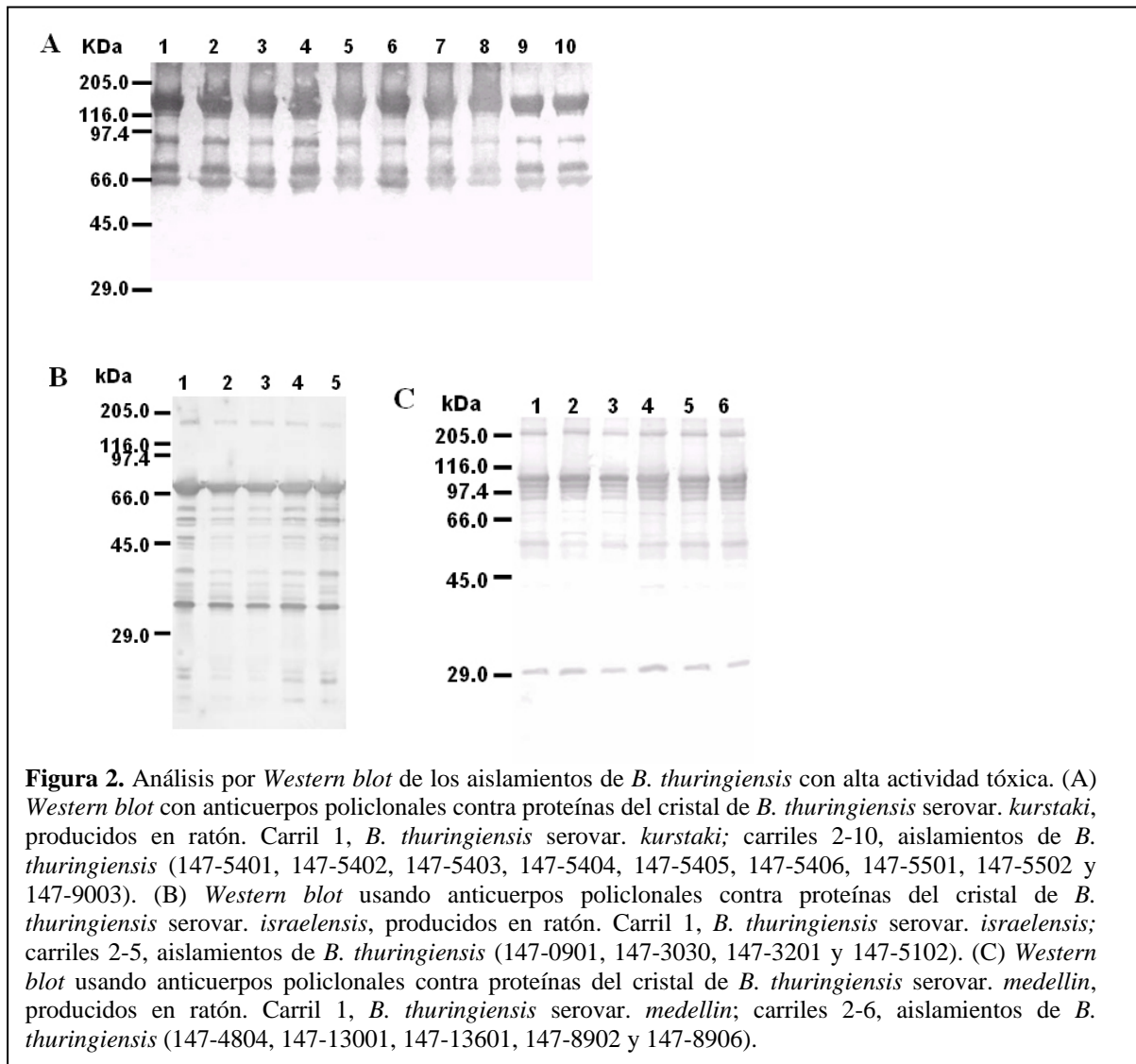
El 65% de los aislamientos del filoplano presentaron actividad contra *S. frugiperda*, el 27% fueron activos contra *C. quinquefasciatus* y el 8% no fueron tóxicos contra ninguna de las especies de insectos evaluadas. Por el contrario, el 88% de los aislamientos de suelo fueron activos contra *C. quinquefasciatus* y solamente el 12% contra *S. frugiperda*. Ningún aislamiento, ni proveniente de filoplano ni de suelo, presentó actividad dual contra las dos especies de insectos evaluadas (Tabla 9).

En los aislamientos provenientes del filoplano se observaron tres perfiles de proteínas, mientras que los aislamientos del suelo mostraron solamente dos perfiles (Figura 1). El 73% de los aislamientos del filoplano mostraron un perfil de proteínas similar al de la cepa de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*. Por otro lado, el 25% de los aislamientos del filoplano y el 88% de los del suelo presentaron un perfil de proteínas del cristal similar a *B. thuringiensis* serovar. *medellin*. Solamente el 2% de los aislamientos del filoplano mostraron un perfil de proteínas del cristal similar a *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*.



Se seleccionaron algunos aislamientos de cada uno de los tres perfiles de proteínas encontrados, que presentaron una actividad tóxica sobresaliente, para ser analizados por *Western blot*. Con los anticuerpos anti-*B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* se reconocieron los aislamientos 147-5401, 147-5402, 147-5403, 147-5404, 147-5405, 147-5406, 147-

5501, 147-5502 y 147-9003 (Figura 2A). Los anticuerpos anti-*B. thuringiensis* serovar. *israelensis* reconocieron los aislamientos 147-0901, 147-3030, 147-3201 y 147-5102 (Figura 2B), y los anticuerpos anti-*B. thuringiensis* serovar. *medellin* reconocieron los aislamientos 147-4804, 147-13001, 147-13601, 147-8902 y 147-8906 (Figura 2C).



Los aislamientos 147-0901, 147-3030, 147-3201 y 147-5102, que tenían genes *cry4* y *cry11*, sobresalieron por su excelente actividad tóxica contra larvas de *C. quinquefasciatus*; muy parecida o superior a la de la cepa utilizada como control, *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. Estos cuatro aislamientos presentaron un perfil de proteínas similar a *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*, que fue confirmado por *Western*

blot. El aislamiento 147-8906, tipo serovar. *medellin*, con un genotipo *cry11*, presentó una excepcional potencia, similar a *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*, a pesar que Orduz *et al.* (1992) demostraron que la potencia de *B. thuringiensis* serovar. *medellin* es aproximadamente 10 veces inferior a la potencia de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. Con los aislamientos activos contra *S. frugiperda* no fue posible establecer ninguna relación entre la presencia de algunos genes *cry1* y su toxicidad, al contrario de lo demostrado por Bravo *et al.* (1998), quienes encontraron que las cepas con genes *cry1C* y *cry1D* presentaron mayor toxicidad contra larvas de *S. exigua* y *S. frugiperda*. En el presente estudio solamente un aislamiento (147-3003) presentó la combinación de los genes *cry1C* y *cry1D*, pero su toxicidad no fue sobresaliente.

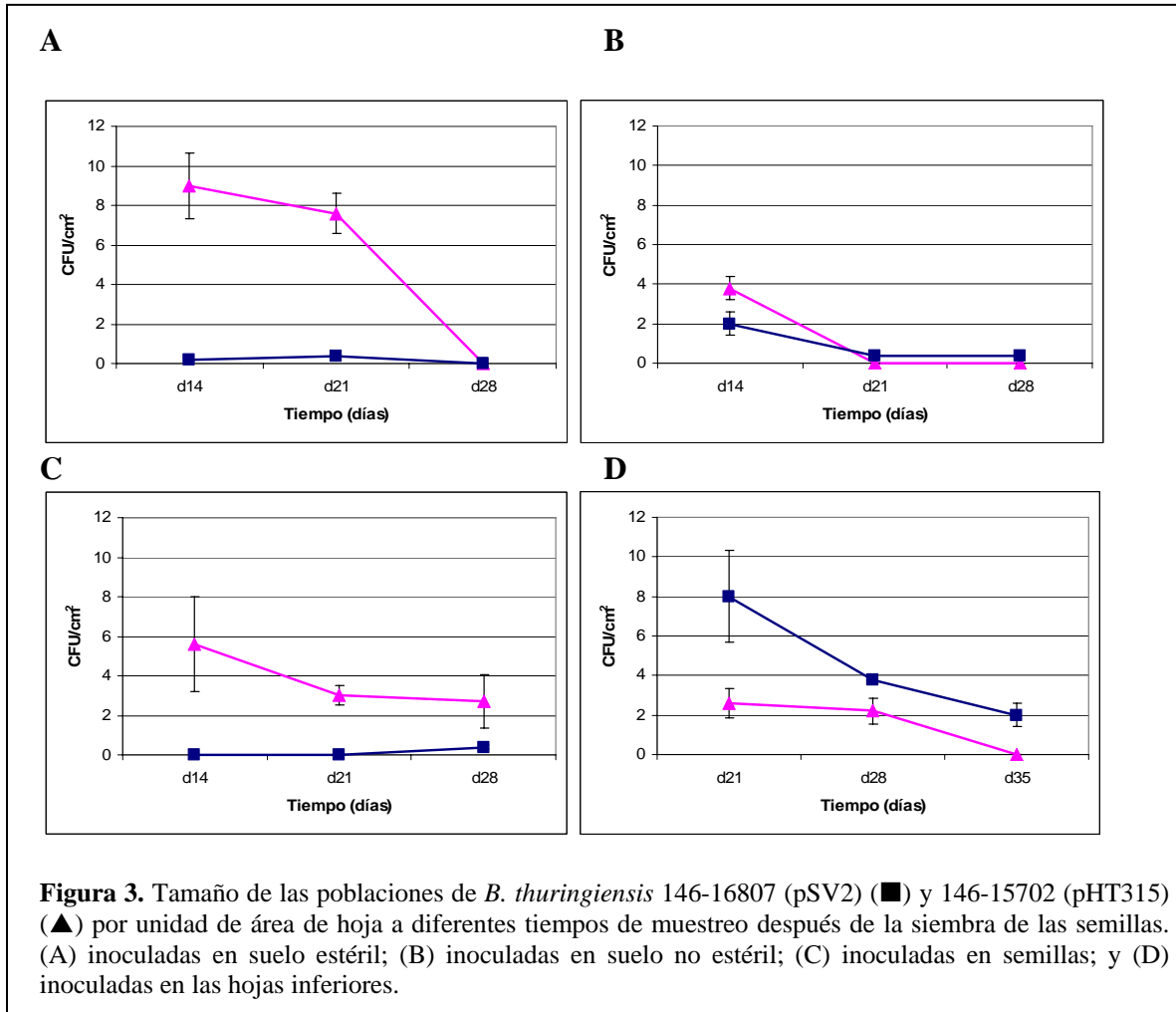
Al analizar estadísticamente las características de las cepas de *B. thuringiensis* (morfología del cristal, presencia de genes *cry*, perfil de proteínas y toxicidad) se encontraron, en todos los casos, diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Se pudo observar que las cepas aisladas de suelo y de filoplano presentaban, en general, unas características muy diferentes. Las cepas procedentes de hojas tenían cristales bipiramidales (73%), genes *cry1* (75%), un perfil de proteínas similar al de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* (73%), y fueron tóxicas contra *S. frugiperda* (65%). Las cepas procedentes del suelo presentaron cristales redondos (88%), genes *cry11* (88%), perfil de proteínas similar a *B. thuringiensis* serovar. *medellin* (88%), y fueron tóxicas contra *C. quinquefasciatus* (88%). Todo esto sugiere que la mayor parte de aislamientos encontrados en filoplano, tanto de maíz como de fríjol, corresponden al tipo *kurstaki*, mientras que la mayor parte de aislamientos de *B. thuringiensis* aislados en los suelos de fríjol y de maíz, corresponden al tipo *medellin*. Este resultado es muy similar al reportado en otros trabajos (Smith y Couche, 1991; Ohba, 1996; Damgaard *et al.*,

1997b; Mizuki *et al.*, 1999; Maduell *et al.*, 2002), donde en todos ellos predominaron cepas de *B. thuringiensis* con características parecidas a la serovar. *kurstaki* aisladas del filoplano de distintas especies vegetales. Además nuestros resultados concuerdan con los de otro estudio (Chilcott y Wigley, 1993), en el que se aislaron un alto porcentaje de cepas activas contra dípteros de muestras de suelos, pero al mismo tiempo es diferente al reportado por Ohba y Aizawa (1986), en el que en muestras de suelos predominaron las cepas no tóxicas para lepidópteros, dípteros ni coleópteros.

5.3. Migración de *B. thuringiensis* a hojas de fríjol desde el suelo o desde hojas distantes (Artículo III)

Las poblaciones naturales de *B. thuringiensis* en hojas son de 10^2 - 10^3 cfu/cm² (Maduell *et al.*, 2002; Collier *et al.*, 2005). Estas bacterias pueden haber colonizado las plantas de diferentes maneras: por deposición atmosférica, contaminación de las comunidades del suelo a través del viento y la lluvia, colonización gracias a los insectos, o migración desde las raíces hasta las hojas (Lindow y Andersen, 1996). En este trabajo se intentó eliminar los diferentes factores externos que favorecen estos mecanismos de colonización, colocando las plantas en condiciones controladas. Se inocularon dos cepas de *B. thuringiensis* (146-15702 (pHT315) y 146-16807 (pSV2)) en suelos, semillas y hojas jóvenes de plantas de fríjol para determinar si *B. thuringiensis* es capaz de migrar a las hojas superiores. Los resultados se muestran en la figura 3.

En todos los tratamientos se recuperó *B. thuringiensis* de las hojas superiores, sugiriendo que el suelo puede contribuir a la formación de las poblaciones de las hojas. Todos los aislamientos recuperados correspondían a las cepas inoculadas previamente,



tal y como se demostró en los estudios de la morfología del cristal y de PCR, indicando que no existieron problemas de contaminación cruzada entre diferentes plantas durante el experimento. En las plantas control (no inoculadas) no se recuperaron células ni endosporas de *B. thuringiensis*.

Aproximadamente la mitad de las poblaciones recuperadas de *B. thuringiensis* eran endosporas, lo que sugiere que la superficie de las hojas es un ambiente estresante, que estimula la esporulación. El número de células de *B. thuringiensis* en las hojas superiores fue muy bajo comparado con las concentraciones que se inocularon. En todos los casos se obtuvieron valores inferiores a 10 cfu/cm². El hecho de que la población de *B. thuringiensis* en todos los tratamiento fuera muy baja sugiere que esta bacteria migra

con bastante dificultad del suelo o las semillas a las hojas, o incluso entre diferentes hojas de la misma planta, al menos en las condiciones de este estudio. En este trabajo no se concluyó sobre el posible mecanismo de migración; de todas formas podría estar asociado a procesos endofíticos, como se ha observado recientemente con *Rhizobium* spp. en plantas de arroz (Chi *et al.*, 2005); o también podría estar relacionado con una inoculación con *B. thuringiensis* en los meristemos durante las fases iniciales del desarrollo de la planta. En general, el suelo, las semillas o las hojas de las plantas actúan igual como reservorio e inóculo de cepas de *B. thuringiensis* para colonizar hojas superiores de la planta.

La población epífita de *B. thuringiensis* en las hojas superiores decreció a lo largo del tiempo en estos experimentos. Mientras que el número de células de *B. thuringiensis* no disminuía en una misma hoja, la población bacteriana epífita de *B. thuringiensis* disminuía a medida que se tomaban hojas más distantes del suelo o de las hojas inoculadas. Es decir, a medida que una hoja estaba más lejos del suelo, la probabilidad que hubiera estado directa o indirectamente (a través de una yema apical) en contacto con endosporas o células de *B. thuringiensis* era inferior. Sin embargo, en el suelo las poblaciones de *B. thuringiensis* se mantuvieron elevadas y constantes, con valores cercanos a los de la inoculación (10^7 cfu/g de suelo). Esto no solamente confirma que como especie, *B. thuringiensis* está bien adaptada al suelo (Martin y Travers, 1989; Bernhard *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1998) sino que además confirma que el suelo puede ser una fuente de inóculo perdurable, que permite la formación de poblaciones epífitas.

En general, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de *B. thuringiensis* en los diferentes tratamientos realizados con las dos cepas. Sin

embargo, cuando la cepa 146-16807 (pSV2) se inoculó en plantas jóvenes se encontraron poblaciones más altas que en los otros tratamientos ($p=0,001$). En los tratamientos con suelo estéril o con semillas inoculadas, la cepa 146-15702 (pHT315) mostró poblaciones epífitas más altas que la cepa 146-16807 (pSV2). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se inocularon suelos naturales. Cuando se inocularon hojas jóvenes, la cepa 146-16807 (pSV2) mostró poblaciones epífitas superiores a la cepa 146-15702 (pHT315), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los resultados de este trabajo muestran que una cepa activa contra lepidópteros y otra activa contra dípteros tienen la misma capacidad de migrar y de sobrevivir en las hojas. Si bien parece que la cepa 146-16807 (pSV2) (tóxica para lepidópteros) colonizó ligeramente mejor las hojas.

5.4. Determinación de la capacidad de *B. thuringiensis* de colonizar la superficie de las hojas (Artículo IV)

Se ha reportado ampliamente la presencia de *B. thuringiensis* en las hojas (Maduell *et al.*, 2002; Nair *et al.*, 2002; Uribe *et al.*, 2003; Collier *et al.*, 2005), tanto en ambientes naturales como agrícolas, pero nunca se han realizado estudios de la capacidad de esta bacteria de colonizar y de sobrevivir en este ambiente. En este trabajo se inocularon plantas de frijol con diferentes cepas de *B. thuringiensis*, y se colocaron secuencialmente en condiciones secas y húmedas; posteriormente, se midió el tamaño de la población de *B. thuringiensis* para evaluar la capacidad de esta bacteria de crecer y sobrevivir en las hojas (Figura 4). El tamaño de la población de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* aumentó de 10^4 cfu/g de hoja (en el momento del inóculo) a 5×10^5 cfu/g 24 h después. Mientras que el incremento de la población fue rápido en las

primeras 24 h, no se observaron incrementos importantes posteriores a pesar de encontrarse en condiciones de alta humedad.

Dado que un gran número de especies bacterianas, incluso algunas no consideradas comunes en este ambiente como *Salmonella*, son capaces de alcanzar poblaciones bastante altas en este ambiente (O'Brien y Lindow, 1989; Brandl y Mandrell, 2002; Brandl *et al.*, 2004), fue sorprendente que *B. thuringiensis* tuviera una pobre capacidad de colonización de las hojas, incluso en condiciones óptimas.

De hecho, *P. fluorescens* cepa A506 alcanzó en este estudio poblaciones 100 veces más altas que cualquiera de las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas. La población natural de bacterias de las hojas en las que se inoculó *B. thuringiensis* también fue capaz de alcanzar poblaciones de 10^7 cfu/g de hoja, unos niveles muy similares a los conseguidos en las plantas inoculadas con *P. fluorescens*, lo que nos hace suponer que esta deba ser la capacidad de carga máxima para bacterias epífitas en las hojas de fríjol. Es posible que *B. thuringiensis* sea simplemente un muy débil competidor para los nutrientes de las hojas, comparado con otras bacterias epífitas. Sin embargo, varios indicios sugieren que *B. thuringiensis* no es capaz de acceder a los nutrientes que están disponibles en las hojas. Por ejemplo, todas las cepas de *B. thuringiensis* mostraron una gran frecuencia de esporulación a las 12 h de haber inoculado hojas de fríjol con células vegetativas. En este tiempo las poblaciones de bacterias epífitas se encontraban todavía en una fase de rápido crecimiento, lo que sugiere que la disponibilidad de nutrientes era adecuada para ellas.

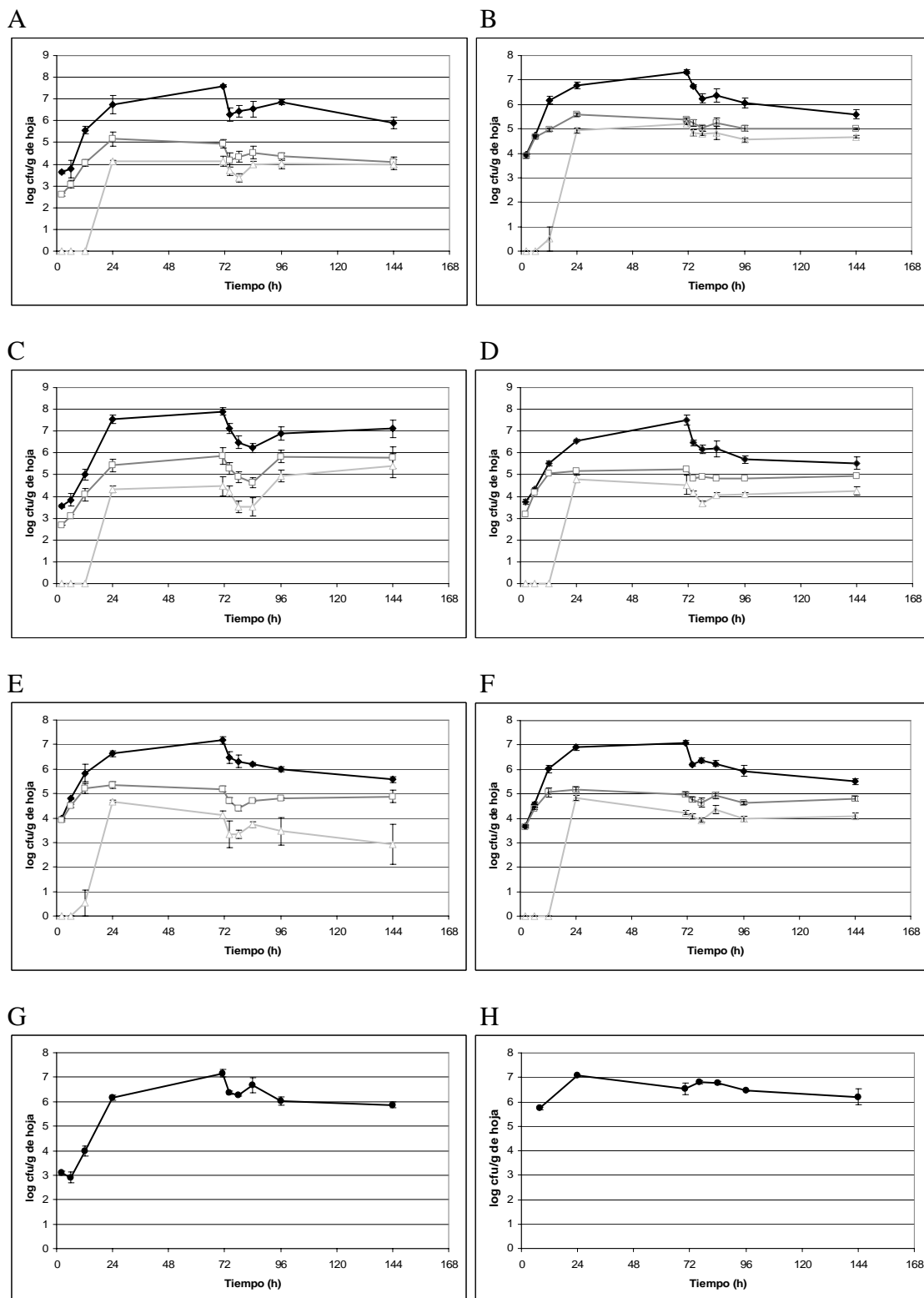
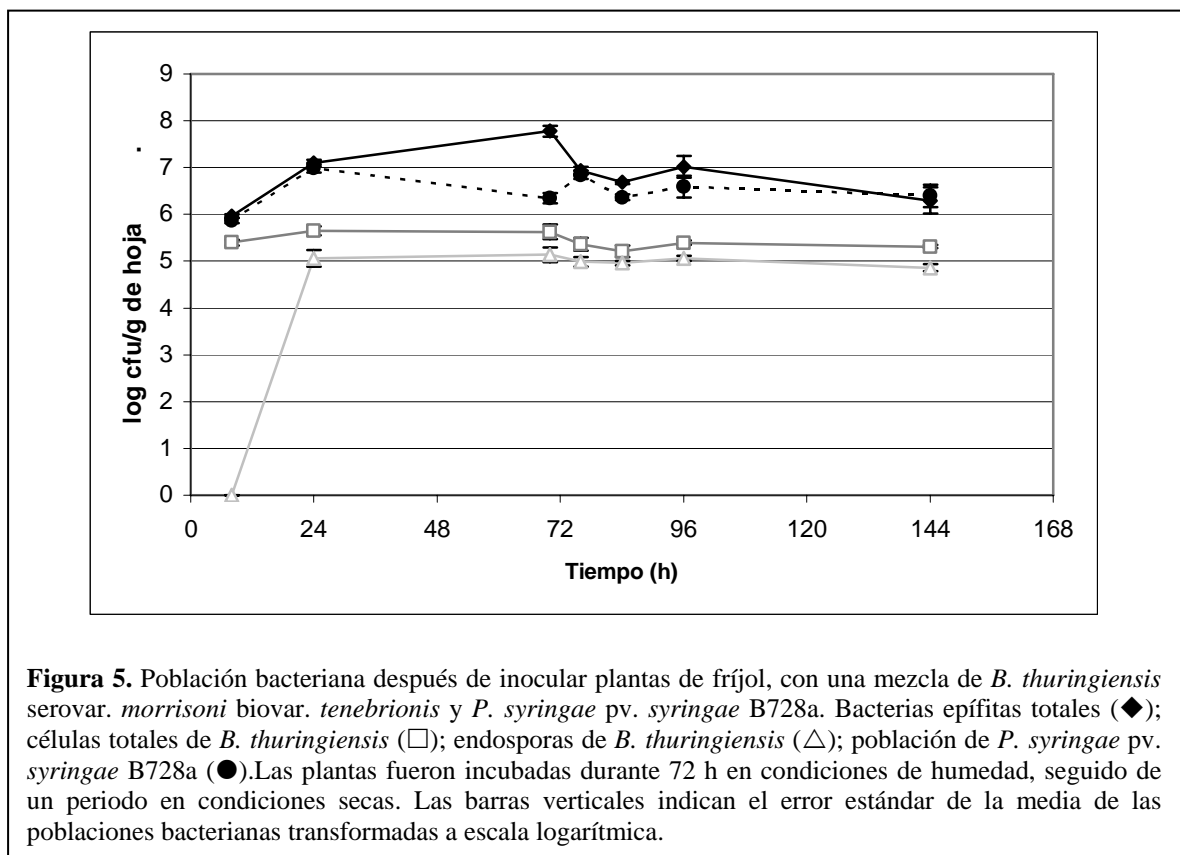


Figura 4. Poblaciones epífitas de (A) *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1; (B) *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* biovar. *tenebrionis*; (C) *B. thuringiensis* cepa 146-15702; (D) *B. thuringiensis* cepa 146-16807; (E) *B. thuringiensis* cepa 146-3804; (F) *B. thuringiensis* cepa 147-5406; (G) *P. fluorescens* A506; y (H) *P. syringae* pv *syringae* B728a, a diferentes tiempos después de la inoculación. Bacterias epífitas totales (◆); células totales de *B. thuringiensis* (□); endosporas de *B. thuringiensis* (△); población de *Pseudomonas* spp. (●). Las plantas fueron incubadas durante 72 h en condiciones de humedad, seguido de un periodo en condiciones secas. Las barras verticales indican el error estándar de la media de las poblaciones bacterianas transformadas a escala logarítmica.

A pesar de que *B. thuringiensis* tiene una capacidad baja de multiplicarse en las hojas, se ha observado que tiene una capacidad alta de sobrevivir en este ambiente. Cuando se da un cambio en las condiciones ambientales, y se pasa de un ambiente húmedo a seco, las poblaciones de las bacterias epífitas sufren un descenso de entre 10 y 100 veces (O'Brien y Lindow, 1989; Beattie y Lindow, 1994a, 1994b). En este trabajo *P. fluorescens* cepa A506 disminuyó su población por encima de 10 veces. En otros estudios, las poblaciones de *P. agglomerans*, *P. chlororaphis* y *P. syringae* disminuyeron 43, 32 y 20 veces, respectivamente, después de pasar de unas condiciones húmedas a secas (Brandl y Mandrell, 2002). En cambio, al sufrir un estrés por desecación, las poblaciones de las diferentes cepas *B. thuringiensis* disminuyeron ligeramente para recuperar posteriormente los niveles anteriores, en condiciones de alta humedad. La tolerancia al estrés por parte de *B. thuringiensis* es probablemente debido a la alta proporción de endosporas (tolerantes a la sequía) que forman su población.

Es conocido que *B. thuringiensis* produce lactonas capaces de hidrolizar N-acil-L-homoserin lactonas (AHL), moléculas involucradas en *quorum sensing*, convirtiéndolas en productos inactivos (Dong *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002b). En estudios anteriores, la co-inoculación de *B. thuringiensis* con *Erwinia carotovora* (especie que coordina sus procesos de fitopatogenia mediante AHL) permitió disminuir los síntomas de la enfermedad vegetal (Dong *et al.*, 2002). En el caso de *P. syringae*, su patogenia y su eficiencia de colonización está aparentemente controlada por un sistema de *quorum sensing* relacionado con la producción de AHL (Quinones *et al.*, 2005). Por eso, se decidió inocular conjuntamente *P. syringae* y *B. thuringiensis* serovar. *tenebrionis* para ver si *B. thuringiensis* era capaz de limitar la fitness de *P. syringae*. Se observó que el crecimiento y la supervivencia de *P. syringae* no estaba afectada por *B. thuringiensis* y

viceversa (Figura 5). Podría ser que la población de *B. thuringiensis* no fuera suficientemente grande como para afectar de manera significativa a la concentración de AHL y por tanto a la población de *P. syringae*. También podría ser que como *P. syringae* generalmente forma agregados celulares, las poblaciones de *P. syringae* y *B. thuringiensis* no fueran suficientemente confluentes como para producirse una degradación de AHL. Como conclusión, estos resultados obtenidos sugerían que *B. thuringiensis* no estaría protegiendo a la planta de otras bacterias patógenas.



Las diferentes cepas de *B. thuringiensis* utilizadas en este estudio, las cuales comprendían tanto cepas comerciales como cepas aisladas de hojas de plantas, mostraron un comportamiento muy similar. Se debería haber esperado que, si *B. thuringiensis* fuera una especie mutualista de plantas, las cepas aisladas de hojas mostrarán una mayor fitness que las cepas comercializadas como insecticidas, como *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1, o *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* biovar.

tenebrionis. El hecho de que las cepas aisladas de hojas no difieran ni en sus poblaciones máximas sobre las hojas ni en su capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés por sequía, sugiere que en la historia de esta especie no ha ocurrido una selección en este sentido.

Las cepas de *B. thuringiensis* 146-15702, 146-16807 y *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 se transformaron para expresar el gen *gfp*, y poder así ser observadas *in situ* en la hoja mediante microscopía después de su inoculación. Estas cepas fueron inoculadas sobre plantas de fríjol que fueron mantenidas durante dos días en condiciones de humedad; después se observaron las poblaciones de *B. thuringiensis* para determinar su distribución y sus patrones de agregación sobre las hojas. Esto coincidía con la baja recuperación de *B. thuringiensis* después de la colonización. Se observaron pocas células de *B. thuringiensis* con fluorescencia verde sobre las hojas, aproximadamente 30 células /cm² de hoja (Figura 6).

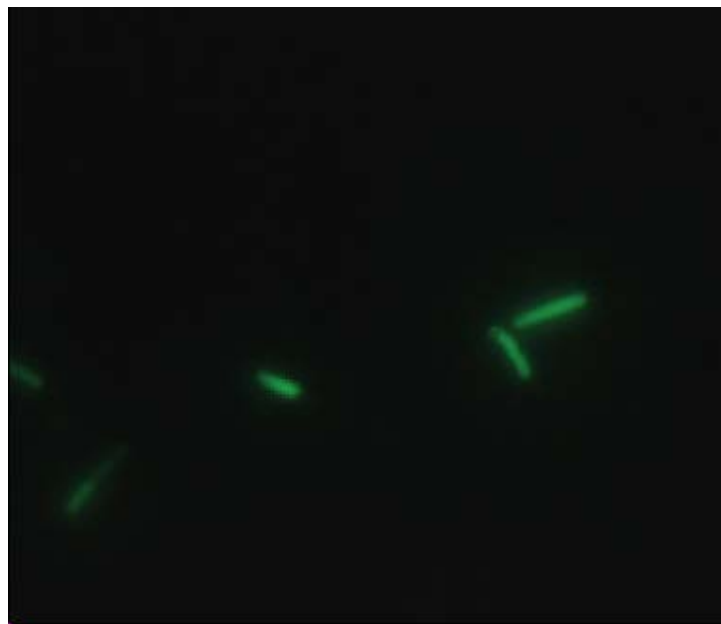


Figura 6. Fluorescencia de Gfp mostrada por las células de *B. thuringiensis* 146-15702 (pSB2019) en hojas de fríjol, observada mediante microscopía de epifluorescencia, 48 h después de la inoculación. (Aumento: X1.000).

Las células de *B. thuringiensis* no formaron grandes agregados, y en general las células estaban solitarias. Se observaron algunos grupos de 2 a 10 células, pero éstos eran formados por menos del 20% de las células de las hojas. Cabe destacar que especies como *P. syringae* y *Erwinia herbicola* forman grandes agregados de células (Monier y Lindow, 2004). Seguramente, las agrupaciones de *B. thuringiensis* encontradas son el resultado de una a cuatro divisiones celulares de una de las células originales del inóculo. Puesto que la disponibilidad de nutrientes en la hoja resulta ser muy heterogénea (Leveau y Lindow, 2001), solamente una pequeña proporción de las células que llegan a la hoja pueden encontrar una concentración suficiente de nutrientes como para permitirle un crecimiento. Estas células podrían realizar algunas divisiones celulares antes de encontrar una situación desfavorable e iniciar un proceso de esporulación.

Además, no se observaron asociaciones de las células con alguna de las estructuras de las hojas, como los estomas, tricomas o venas. Las endosporas no se pudieron observar debido al hecho que estas no expresaban el gen *gfp*.

5.5. Capacidad de *B. thuringiensis* de crecer *in vitro* en medios que simulan el medio ambiente de la hoja (Artículos III y IV)

El crecimiento de *B. thuringiensis* y otras bacterias epífitas fue estudiado en un medio de cultivo rico (LB) y en un medio que simula la composición y la concentración de los nutrientes de la superficie de la hoja (BDM), para evaluar si la baja recuperación de aislamientos de *B. thuringiensis* estaba asociada a un pobre crecimiento de esta especie en la superficie de las plantas. En LB, *B. thuringiensis* 146-15702 fue la cepa que

mostró el mayor crecimiento, mientras que las otras cepas de *B. thuringiensis* también crecieron rápidamente en este medio (Tabla 11). Las otras especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* mostraron un crecimiento inferior que las cepas de *B. thuringiensis*. En cambio, en el medio BDM, el crecimiento de las cepas de *B. thuringiensis* fue muy inferior a las otras cepas (Tabla 12).

Tabla 11. Crecimiento de las colonias bacterianas en placas de LB medidas en mm a lo largo del tiempo.

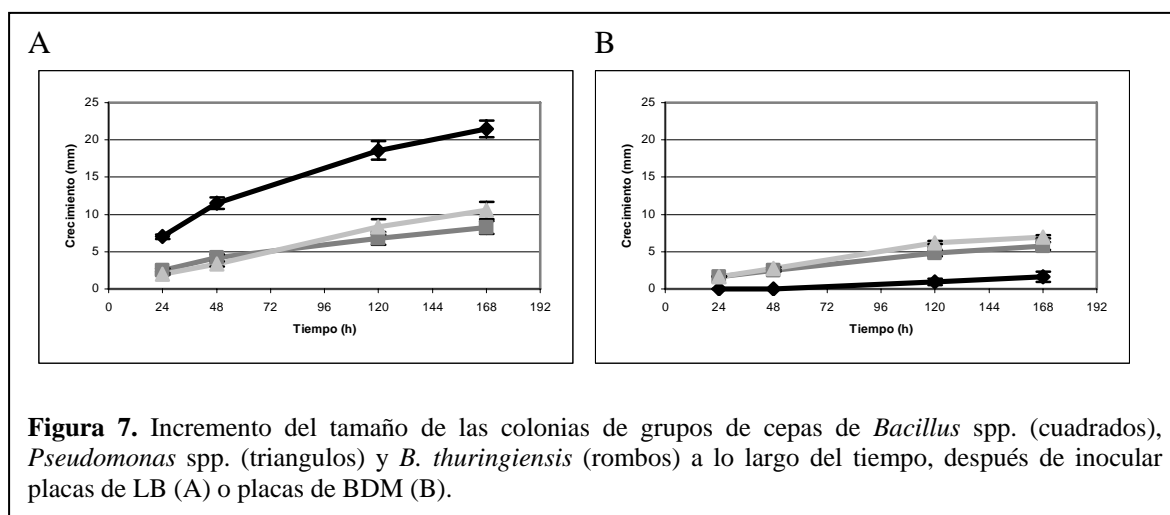
Cepa	Crecimiento medio (SD)			
	24h	48h	120h	168h
<i>B. thuringiensis</i> 15702	8,0 (0,8)	14 (1,3)	23 (2,0)	25 (2,9)
<i>B. thuringiensis</i> 16807	6,8 (0,9)	11 (1,1)	17 (1,2)	19 (1,6)
<i>B. thuringiensis</i> serovar. <i>kurstaki</i> HD1	6,3 (0,7)	9,8 (0,9)	16 (1,1)	20 (2,0)
<i>B. licheniformis</i> F23	1,3 (0,6)	2,3 (0,6)	4,3 (1,5)	6,3 (0,6)
<i>B. subtilis</i> F24	2,3 (0,6)	3,3 (1,2)	6,0 (1,0)	7,7 (0,6)
<i>B. amyloliquefasciens</i> F26	2,7 (0,6)	4,0 (0,1)	4,7 (0,6)	5,7 (0,6)
<i>B. licheniformis</i> F29	2,0 (1,0)	3,7 (2,1)	4,7 (2,1)	5,7 (1,5)
<i>B. mycoides</i> F30	4,3 (0,6)	7,7 (0,6)	14 (0,6)	16 (1,4)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>sesami</i> F3	2,0 (1,0)	2,3 (0,6)	4,3 (0,6)	5,7 (0,6)
<i>P. viridiflava</i> F4	3,0 (0,0)	5,7 (0,6)	13 (1,5)	18 (2,0)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>syringae</i> F8	2,3 (0,6)	4,3 (1,5)	14 (2,1)	16 (3,2)
<i>P. viridiflava</i> F12	1,3 (0,6)	2,0 (0,1)	5,0 (0,1)	6,7 (0,6)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>zizante</i> F14	1,3 (0,6)	2,3 (0,6)	4,7 (1,2)	6,7 (1,2)

Tabla 12. Crecimiento de las colonias bacterianas en placas de BDM medidas en mm a lo largo del tiempo.

Cepa	Crecimiento medio (SD)			
	24h	48h	120h	168h
<i>B. thuringiensis</i> 15702	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<i>B. thuringiensis</i> 16807	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,7)	0,9 (1,1)
<i>B. thuringiensis</i> serovar. <i>kurstaki</i> HD1	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,4 (0,8)	4,0 (1,3)
<i>B. licheniformis</i> F23	1,7 (0,6)	3,7 (1,2)	7,3 (1,2)	9,3 (2,1)
<i>B. subtilis</i> F24	1,7 (0,6)	1,7 (0,6)	2,3 (0,6)	2,7 (0,6)
<i>B. amyloliquefasciens</i> F26	1,3 (0,6)	2,0 (1,0)	4,7 (0,6)	5,3 (0,6)
<i>B. licheniformis</i> F29	2,0 (1,0)	2,7 (0,6)	5,0 (1,0)	5,7 (0,6)
<i>B. mycoides</i> F30	1,7 (0,6)	n.d.*	n.d.	n.d.
<i>P. syringae</i> patovar. <i>sesami</i> F3	1,3 (0,6)	1,7 (0,6)	6,7 (1,2)	7,3 (1,5)
<i>P. viridiflava</i> F4	2,0 (0,0)	2,7 (0,6)	5,7 (0,6)	6,3 (1,2)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>syringae</i> F8	2,0 (0,1)	3,7 (1,2)	6,7 (2,1)	7,3 (1,5)
<i>P. viridiflava</i> F12	1,7 (0,6)	3,7 (1,5)	7,3 (2,5)	8,3 (2,5)
<i>P. syringae</i> patovar. <i>zizante</i> F14	1,3 (0,6)	2,0 (0,1)	4,7 (1,2)	5,7 (0,6)

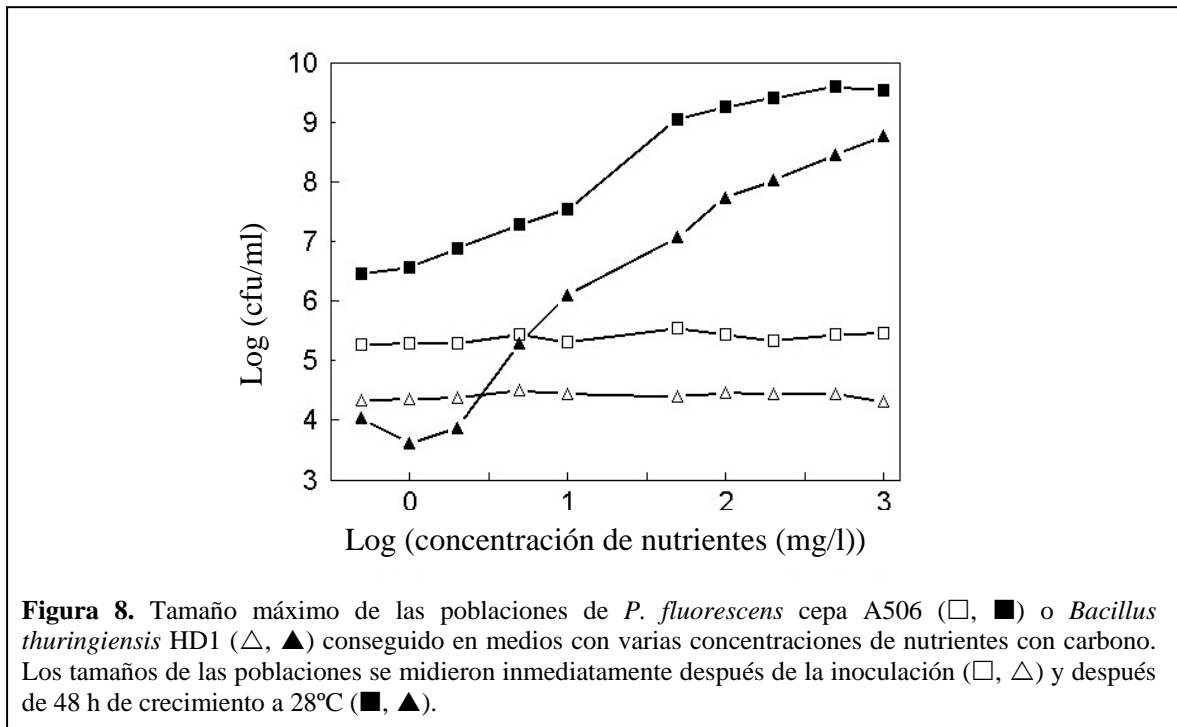
* n.d., no realizado.

Al agrupar todos los datos de las diferentes cepas en grupos (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *B. thuringiensis*) se observó claramente que el crecimiento de las cepas de *B. thuringiensis* en medio LB era muy superior al de las cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., pero muy inferior en medio BDM (Figura 7).



En un segundo ensayo se transfirieron cultivos de *P. fluorescens* cepa A506 y *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD1 en fase exponencial de crecimiento, a medios de cultivo que contenían diferentes concentraciones de casaminoácidos como fuente de nutrientes. Como era de esperar, el número de células recuperado inmediatamente después de haber inoculado es independiente de la concentración de nutrientes (Figura 8). El crecimiento máximo se observó a las 48 h; ningún cultivo alcanzó valores más altos después de este tiempo. A las 48 h de la inoculación, la población de *P. fluorescens* había incrementado por encima de los valores iniciales en todos los casos. El tamaño de la población había incrementado proporcionalmente a la concentración de nutrientes en el rango de 0,5 mg/l hasta 200 mg/l, superando en casi todos los casos concentraciones de 10^7 células/ml. En cambio, no se observó un incremento neto de la población en el caso de los cultivos con *B. thuringiensis* a concentraciones inferiores a 5 mg/ml. El tamaño final de la población aumentó a medida que aumentaba la

concentración de nutrientes, de la misma forma que hacía *P. fluorescens*, pero sólo a partir de una concentración de nutrientes superior a 10 mg/l. Es importante destacar que la máxima concentración de células de *B. thuringiensis* obtenidas a concentraciones de nutrientes superiores a 10 mg/l, siempre fue aproximadamente unas 100 veces inferior a las obtenidas con cultivos de *P. fluorescens*.



Se ha propuesto que la disponibilidad de compuestos de carbono podría ser el mayor factor limitante para las poblaciones bacterianas epífitas (Wilson y Lindow, 1994; Mercier y Lindow, 2000; Leveau y Lindow, 2001). Las plantas que aportan una cantidad baja de nutrientes en los exudados foliares son capaces de soportar poblaciones inferiores de bacterias epífitas (Mercier y Lindow, 2000). Sin embargo, se ha visto que el fríjol es capaz de aportar una gran cantidad de exudados foliares, que le permite soportar poblaciones bacterianas grandes.

En el presente estudio se obtuvo una evidencia directa de que *B. thuringiensis* no es capaz de crecer en ambientes con una baja concentración de nutrientes, comparado con

P. fluorescens, una especie que ha demostrado ser un eficiente colonizador de hojas. Es bastante claro que en condiciones de bajas concentraciones de nutrientes, *B. thuringiensis* no encuentra las condiciones adecuadas para su crecimiento y esporula, por lo que no es capaz de alcanzar poblaciones del tamaño de las otras bacterias epífitas. Partiendo del hecho de que la concentración de azúcares en una hoja de fríjol es generalmente inferior a 10 mg/l (suponiendo que los nutrientes en una hoja se encuentran en un ml de agua cuando la hoja está húmeda) (Mercier y Lindow, 2000), no debería esperarse un crecimiento elevado de *B. thuringiensis* en las hojas. Esto confirmaría la idea de que *B. thuringiensis* debe ser considerado como copiotrofo, puesto que requiere una relativa gran concentración de nutrientes para su óptimo crecimiento.

5.6. Consideraciones generales acerca de la ecología de *B. thuringiensis* en el filoplano

Tanto en el Artículo I como en el Artículo II se hizo una aproximación de la población real de bacterias de *B. thuringiensis* (endosporas y/o células vegetativas viables) por cm² de hoja. En el Artículo I se encontraron valores de entre 2 y 5x10³ cfu por cm² de hoja en ambiente boscoso; Smith y Couche (1991) reportaron en hojas de árboles valores de entre 3 y 10² endosporas de *B. thuringiensis* por cm² de hoja. Es muy probable que estas diferencias de un orden de magnitud se deban a que Smith y Couche (1991) realizaron choque de calor en la metodología del aislamiento (para eliminar microorganismos no formadores de endosporas), y con este procedimiento eliminaron también las células de *B. thuringiensis* en estado vegetativo, lo cual podría llevar a la conclusión de que una parte de las células viables de *B. thuringiensis* que se encuentran

en las hojas están en estado vegetativo, y no en forma de endospora. Por otro lado, en el Artículo II las poblaciones de *B. thuringiensis* oscilaron de 0 a 34 cfu/cm². En este caso la diferencia probablemente sea debida a que las especies estudiadas formaban parte de un ecosistema agrario. Este tipo de ecosistemas se caracteriza por una menor biodiversidad que los ecosistemas naturales.

Otros trabajos en los que se han reportado valores relativos de las poblaciones de *B. thuringiensis* son Kaur *et al.* (2000) y Collier *et al.* (2005), que encontraron poblaciones de 4 endosporas/g de hoja en leguminosas comestibles y 10¹ - 10³ cfu/g de *Rumex obtusifolius*, respectivamente. Aunque estos datos son de difícil comparación con los anteriores, debido a que las unidades son diferentes, se observa que Kaur *et al.* (2000) obtuvieron en ambientes agrícolas unos valores muy inferiores a los de Collier *et al.* (2005) en ambientes naturales. De todas formas todos estos estudios se han realizado en diferentes especies por lo que la comparación entre ellos debe ser tomada con precaución.

Tanto en el Artículo I como en el Artículo II, se encontró que las poblaciones mayoritarias de la superficie de las hojas tienen características propias de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*: cristales bipiramidales, presencia de genes *cryI*, perfiles de proteínas tipo *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* y toxicidad contra lepidópteros. Uno de los principales órdenes de defoliadores es sin lugar a duda el orden *Lepidoptera* y precisamente éste es el orden más susceptible a las toxinas Cry1. Estos resultados confirmaban lo que había sido observado anteriormente de forma parcial por otros autores (Smith y Couche, 1991; Ohba, 1996; Damgaard *et al.*, 1997b; Collier *et al.*, 2005). Lo que estaba todavía lejos de ser comprobado es si las plantas mantienen una

relación mutualista con *B. thuringiensis* para luchar contra las especies que las depredan, como planteaban Smith y Couche (1991). Por este motivo se decidió estudiar con más detalle la migración, colonización y la supervivencia de diferentes cepas de *B. thuringiensis* en hojas de fríjol en condiciones de humedad y temperatura controladas. Sin embargo, no se pudo encontrar una relación de mutualismo *B. thuringiensis* – planta de fríjol (*P. vulgaris*).

B. thuringiensis tiene una distribución que incluye varios hábitats. Es muy probable que las endosporas de *B. thuringiensis* pasen a las hojas de las plantas mediante el viento o por contacto directo con el suelo durante la germinación de la planta. En las hojas, *B. thuringiensis* puede vivir en forma de endospora y/o en forma vegetativa. Debe existir algún mecanismo de selección y propagación de cepas activas contra defoliadores (principalmente lepidópteros) en las hojas diferente que en el suelo (Damgaard, 1996; Damgaard *et al.*, 1997b); (Maduell *et al.*, 2006)). Además, el mecanismo que usa *B. thuringiensis* para matar larvas de insectos es extremadamente específico. Esta especificidad ha ocurrido presuntamente por un proceso de co-evolución de las toxinas de *B. thuringiensis* y de los receptores intestinales de las larvas de insectos (de Maagd *et al.*, 2001). La bacteria y el insecto blanco deben haber compartido el mismo nicho ecológico para permitir tales interacciones, sugiriendo que las serovariedades de *B. thuringiensis* tóxicas contra lepidópteros deben haber habitado las partes aéreas de la planta por mucho tiempo. Cuando están en la hoja es cuando pueden ser ingeridas por algún insecto fitófago. Después, la hoja o el insecto caen al suelo, donde se mantendría un reservorio de cepas. Desde el suelo se podría reiniciar el ciclo.

En el Artículo III se encontró que *B. thuringiensis* tiene una capacidad muy reducida de migrar desde el suelo a las hojas, por lo que las poblaciones que hay en las hojas probablemente hayan llegado por otros mecanismos, como deposición atmosférica (Kinkel, 1997) y/o insectos. Esto explicaría por qué las poblaciones que se encuentran en las hojas son relativamente diferentes a las que se encuentran en los suelos aledaños, tal y como se observó en el Artículo II.

En el Artículo IV se evaluó la capacidad de crecimiento de *B. thuringiensis* en las hojas de fríjol y se observó que, aunque *B. thuringiensis* puede crecer en las hojas, alcanza poblaciones inferiores a las que alcanzan otras bacterias epífitas como *Pseudomonas* spp. En contraposición, también se observó que *B. thuringiensis* tiene una mayor capacidad de adaptación a las condiciones adversas que se producen en las hojas, mediante una rápida esporulación. Esto le permite mantener unas poblaciones mínimas, en las hojas. Faltaría ver si estas mínimas poblaciones son suficientes como para tener una capacidad de intoxicar a una larva de lepidóptero cuando ésta ataque a la planta.

Además, en los Artículos III y IV se evaluó *in vitro* la capacidad de *B. thuringiensis* de crecer en medios con pocos nutrientes, parecidos a los que se encuentran en las hojas. Los resultados mostraron que *B. thuringiensis* es una bacteria que requiere unas concentraciones de nutrientes más elevadas que las que encuentra en las hojas, como las que hay en insectos enfermos o incluso en algunos suelos.

6. CONCLUSIONES

1. *B. thuringiensis* se encuentra en las hojas de las plantas, pero con gran variabilidad en cuanto al número. En un ambiente boscoso se hallaron valores de entre 2 y 5×10^3 cfu/cm² de hoja, mientras que en un ambiente agrícola las poblaciones de *B. thuringiensis* oscilaron de 0 a 34 cfu/cm². En general no se detectaron poblaciones de *B. thuringiensis* características de una especie de planta ni de un estrato altitudinal determinados. Estos resultados se aproximan a los reportados en la literatura.
2. La mayor parte de aislamientos encontrados en el filoplano correspondían a la variedad *kurstaki* (tóxico contra lepidópteros), mientras que la mayor parte de aislamientos de *B. thuringiensis* aislados en los suelos de fríjol y de maíz fueron de la variedad *medellin* (tóxico contra dípteros). Esto sugería que existe una selección de las poblaciones de *B. thuringiensis* en el filoplano y en el suelo.
3. *B. thuringiensis* tiene una capacidad limitada de migrar desde el suelo, semillas y hojas jóvenes a hojas maduras. Además, las poblaciones de *B. thuringiensis* detectadas en las hojas disminuyeron a lo largo del tiempo, siendo menor el número de células recuperado a medida que las hojas estaban más distantes del suelo.
4. Con independencia de la variedad utilizada, *B. thuringiensis* fue capaz de colonizar la hoja después de haber sido inoculado, bajo condiciones controladas, si bien en cantidades 100 veces inferiores a las de otras especies epífitas como *Pseudomonas* spp. Además, las poblaciones de *B. thuringiensis*, mayoritariamente en forma de endosporas, se mantuvieron constantes en la hoja a lo largo del tiempo en diferentes condiciones de humedad.

5. No se detectó interacción entre *B. thuringiensis* y otras especies bacterianas habitantes naturales de hojas después de asperjar estas bacterias en las hojas. Asimismo, se observó que *B. thuringiensis* no forma agregados de grandes grupos celulares en la hoja, y no se localiza asociado a ciertas estructuras de la hoja, como estomas, tricomas o venas.

6. *B. thuringiensis* tiene unos requisitos nutricionales mayores que otras especies bacterianas habitantes naturales del filoplano. Se observó que *B. thuringiensis* no es capaz de crecer en medios de cultivo con baja cantidad de nutrientes, semejantes a los de las hojas.

7. El conjunto de resultados obtenidos permite sugerir la siguiente hipótesis acerca del ciclo de *B. thuringiensis*. Las células de *B. thuringiensis* deben llegar a las hojas de las plantas mediante el viento, los insectos o, en menor proporción, por contacto directo con el suelo durante la germinación de la planta, entre otros. En las hojas, *B. thuringiensis* dispone de una concentración insuficiente de nutrientes, lo cual conlleva que parte de las células formen endosporas. Además en las hojas debe existir algún mecanismo de selección de las cepas activas contra defoliadores (principalmente lepidópteros), diferente del que debe actuar en el suelo. En este momento, es cuando *B. thuringiensis* puede ser ingerido por algún insecto fitófago. Después, la hoja y/o el insecto caen al suelo, el cual se convierte en un reservorio de cepas, desde donde debe reiniciarse el ciclo descrito.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Akhurst, R. J., Lyness, E. W., Zhang, Q. Y., Cooper, D. J. y Pinnock, D. E. (1997). A 16S rRNA gene oligonucleotide probe for identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from sheep fleece. *J Invertebr Pathol* 69(1): 24-30.
- Armengol, G., Guevara, O. E., Orduz, S. y Crickmore, N. (2005). Expression of the *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin Cry11Aa in the aquatic bacterium *Asticcacaulis excentricus*. *Curr Microbiol* 51(6): 430-3.
- Armengol, G., Escobar, M. C., Maldonado, M. E. y Orduz, S. (2006). Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *J Appl Microbiol* In Press.
- Beattie, G. A. y Lindow, S. E. (1994a). Comparison of the behavior of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* under controlled and field conditions. *Appl Environ Microbiol* 60(10): 3799-808.
- Beattie, G. A. y Lindow, S. E. (1994b). Survival, growth, and localization of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* on leaves. *Appl Environ Microbiol* 60(10): 3790-8.
- 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(12): 4883-90.
- Berliner, E. (1915). Über die schlaffsucht der mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zel.) und ihren erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 2: 29-56.
- Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Roberts, G. M., Pauli, S., Rodgers, P. y Burges, H. D. (1997). Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol* 70(1): 59-68.
- Blas, M. y Vives, J. M. (1987). Els insectes i els interessos de l'home. En: *Artropodes II*. R. Folch, Ed. Barcelona, Enciclopedia Catalana. pp: 449-80.
- Bourque, S. N., Valero, J. R., Mercier, J., Lavoie, M. C. y Levesque, R. C. (1993). Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 59(2): 523-7.
- Bourque, S. N., Valero, J. R., Lavoie, M. C. y Levesque, R. C. (1995). Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. *Appl Environ Microbiol* 61(7): 2811.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.

- Brandl, M. T. y Mandrell, R. E. (2002). Fitness of *Salmonella enterica* serovar *thompson* in the cilantro phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 68(7): 3614-21.
- Brandl, M. T., Haxo, A. F., Bates, A. H. y Mandrell, R. E. (2004). Comparison of survival of *Campylobacter jejuni* in the phyllosphere with that in the rhizosphere of spinach and radish plants. *Appl Environ Microbiol* 70(2): 1182-9.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J., Pena, G., Nunez-Valdez, M. E., Soberon, M. y Quintero, R. (1998). Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64(12): 4965-72.
- Brousseau, R., Saint-Onge, A., Prefontaine, G., Masson, L. y Cabana, J. (1993). Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *Appl Environ Microbiol* 59(1): 114-9.
- Burges, H. D. y Jones, K. A. (1998). Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. En: Formulation of microbial Biopesticides. H. D. Burges, Ed. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. pp: 33-128.
- Callejas, R. (1997). Piperaceae. Flora de la Expedición Botánica. J. C. Mutis, Ed. Sevilla, España, Casa de la Cultura de España.
- Callejas, R. y Betancur, J. (1997). Nuevas especies de Piperaceas de los Andes de Colombia. *Novon* 6: 210-9.
- Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S. y Koziel, M. G. (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl Environ Microbiol* 57(11): 3057-61.
- Ceron, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. y Bravo, A. (1994). PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 60(1): 353-6.
- Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L. y Bravo, A. (1995). Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 61(11): 3826-31.
- Chak, K. F., Chao, D. C., Tseng, M. Y., Kao, S. S., Tuan, S. J. y Feng, T. Y. (1994). Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from taiwan. *Appl Environ Microbiol* 60(7): 2415-20.
- Chazdon, R. L. y Kaufmann, S. (1993). Plasticity of leaf anatomy in relation to photosynthesis light acclimation. *Functional Ecology* 7: 385-94.
- Chiariello, N. R., Field, C. B. y Mooney, H. A. (1987). Midday wilting in a tropical pioneer tree. *Functional Ecology* 1: 3-11.
- 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: 244-7.

- Collier, F. A., Elliot, S. L. y Ellis, R. J. (2005). Spatial variation in *Bacillus thuringiensis/cereus* populations within the phyllosphere of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius*) and surrounding habitats. *FEMS Microbiol Ecol* 54(3): 417-25.
- Crickmore, N. (2006). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html>. 2006.
- Cronquist, A. y Takhtajan, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York, USA, Columbia University Press.
- Damgaard, P. H. (1996). Environmental aspects of the bacterial insect pathogen *Bacillus thuringiensis*. Ph. D. thesis. Department of Ecology and Molecular Biology. Copenhagen, The Royal Veterinary and Agricultural University.
- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J. y Jorgensen, K. (1996). Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett Appl Microbiol* 23(3): 146-50.
- Damgaard, P. H., Granum, P. E., Bresciani, J., Torregrossa, M. V., Eilenberg, J. y Valentino, L. (1997a). Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Immunol Med Microbiol* 18(1): 47-53.
- Damgaard, P. H., Hansen, B. M., Pedersen, J. C. y Eilenberg, J. (1997b). Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *J Appl Microbiol* 82(2): 253-8.
- Damgaard, P. H., Abdel-Hameed, A., Eilenberg, J. y Smits, P. H. (1998). Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on grass foliage. *World J Microbiol Biotechnol* 14: 239-42.
- de Barjac, H. y Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* 7: 5-31.
- de Maagd, R. A., Bravo, A. y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* 17(4): 193-9.
- DeLucca, A. J., 2nd, Simonson, J. G. y Larson, A. D. (1981). *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can J Microbiol* 27(9): 865-70.
- Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L. y Zhang, L. H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 68(4): 1754-9.
- Drummond, J., Kotze, A. C., Levot, G. W. y Pinnock, D. E. (1995). Increased susceptibility to *Bacillus thuringiensis* associated with pyrethroid resistance in *Bovicola (Damalinia) ovis* (Phthiraptera Mallophaga): possible role of monooxygenases. *J Econ Entomol* 88(6): 1607-10.
- Elliot, S. L., Sabelis, M. W., Janssen, A., van der Geest, L. P. S., Beerling, E. A. M. y Fransen, J. (2000). Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecol Lett* 3(3): 228-35.

- Espinal, L. S. (1992). Geografía ecológica de Antioquia. Zonas de vida. Medellín, Ed. Lealon.
- Gleave, A. P., Williams, R. y Hedges, R. J. (1993). Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of cryV-like insecticidal protein genes and characterization of a cryV gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Appl Environ Microbiol 59(5): 1683-7.
- Golberg, 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: 355-8.
- 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(2): 106-14.
- Hastowo, S., Lay, B. W. y Ohba, M. (1992). Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. J Appl Bacteriol 73: 108-13.
- Helgason, E., Caugant, D. A., Lecadet, M. M., Chen, Y., Mahillon, J., Lovgren, A., Hegna, I., Kvaloy, K. y Kolsto, A. B. (1998). Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. Curr Microbiol 37(2): 80-7.
- Helgason, E., Caugant, D. A., Olsen, I. y Kolsto, A. B. (2000). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. J Clin Microbiol 38(4): 1615-22.
- Hongyu, Z., Ziniu, Y. y Wangxi, D. (2000). Composition and ecological distribution of Cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. J Invertebr Pathol 76(3): 191-7.
- Ignoffo, C. M., Hostetter, D. L. y Sikorowski, P. P. (1977). Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. Environ Entomol 6: 411-315.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M. D., Andrew, R., Murillo, J., Ferre, J. y Caballero, P. (1998). Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. Syst Appl Microbiol 21(1): 97-106.
- Ishiwata, S. (1901). On a kind of severe flacherie (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho 114: 1-5.
- Judd, W. S. (1999). Plant systematics: A phylogenetic approach. Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauer Assoc.
- Kaelin, P., Morel, P. y Gadani, F. (1994). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricornis* (F.). Appl Environ Microbiol 60(1): 19-25.
- Kaelin, P. y Gadani, F. (2000). Occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. Curr Microbiol 40(3): 205-9.

- Kaur, S. y Singh, A. (2000). Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* in leguminous phylloplanes in the New Delhi region of India. *World J Microbiol Biotechnol* 16: 679-82.
- Khyami-Horani, H., Hajaj, M. y Charles, J. F. (2003). Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *jordanica* (serotype H71), a novel serovariety isolated in Jordan. *Curr Microbiol* 47(1): 26-31.
- Kim, H. S., Lee, D. W., Woo, S. D., Yu, Y. M. y Kang, S. K. (1998). Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. *Curr Microbiol* 37(3): 195-200.
- Kim, H. S. (2000). Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. *Curr Microbiol* 41(4): 250-6.
- Koller, C. N., Bauer, L. S. y Hollingworth, R. M. (1992). Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta-endotoxin crystals. *Biochem Biophys Res Commun* 184(2): 692-9.
- Krieg, A. (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 96: 500-8.
- 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* 86(4): 660-72.
- Lee, D. H., Machii, J. y Ohba, M. (2002a). High frequency of *B. thuringiensis* in feces of herbivorous animals maintained in a zoological garden in Japan. *Appl Entomol Zool* 37(4): 509-16.
- Lee, D. H., Cha, I. H., Woo, D. S. y Ohba, M. (2003). Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*: fecal populations recovered from wildlife in Korea. *Can J Microbiol* 49(7): 465-71.
- Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T. y Lee, J. K. (2002b). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 68(8): 3919-24.
- Lerecluse, D., Delécluse, A. y Lecadet, M.-M. (1993). Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. En: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. P. Entwistle, Ed. London, John Wiley and Sons. pp: 37-69.
- Leveau, J. H. y Lindow, S. E. (2001). Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3446-53.
- Lindow, S. E. (1988). Lack of correlation of antibiosis in antagonism of ice nucleation active bacteria on leaf surfaces by non-ice nucleation active bacteria. *Phytopathology* 78: 444-50.

- Lindow, S. E. y Andersen, G. L. (1996). Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. *Appl Environ Microbiol* 62(8): 2978-87.
- Maduell, P., Callejas, R., Cabrera, K. R., Armengol, G. y Orduz, S. (2002). Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of *Piper* (Piperaceae) in three altitudinal levels. *Microb Ecol* 44(2): 144-53.
- Maduell, P., Jara, S. y Orduz, S. (2006). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. *J Appl Microbiol* 101(1): 117-24.
- Maeda, M., Mizuki, E., Nakamura, Y., Hatano, T. y Ohba, M. (2000). Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Curr Microbiol* 40(6): 418-22.
- Marquez, A. M., Dias, J. M. y Ribeiro, B. M. (2000). Screening and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Brazil for the presence of coleoptera-specific *cry* genes. *Microbiol Res* 154(4): 355-62.
- Martin, P. A. y Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 55(10): 2437-42.
- Meadows, M. P., Ellis, D. J., Butt, J., Jarrett, P. y Burges, H. D. (1992). Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl Environ Microbiol* 58(4): 1344-50.
- Mercier, J. y Lindow, S. E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microbiol* 66(1): 369-74.
- Mizuki, E., Ichimatsu, T., Hwang, S.-H., Park, S. Y., Saitoh, H., Higuchi, K. y Ohba, M. (1999). Ubiquity of *Bacillus thuringiensis* on phylloplanes of arboreous and herbaceous plants in Japan. *J Appl Microbiol* 86: 979-84.
- Mizuki, E., Maeda, M., Tanaka, R., Lee, D. W., Hara, M., Akao, T., Yamashita, S., Kim, H. S., Ichimatsu, T. y Ohba, M. (2001). *Bacillus thuringiensis*: a common member of microflora in activated sludges of a sewage treatment plant. *Curr Microbiol* 42(6): 422-5.
- Monier, J. M. y Lindow, S. E. (2004). Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol* 70(1): 346-55.
- Monier, J. M. y Lindow, S. E. (2005a). Spatial organization of dual-species bacterial aggregates on leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol* 71(9): 5484-93.
- Monier, J. M. y Lindow, S. E. (2005b). Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. *Microb Ecol* 49(3): 343-52.
- Nair, J. R., Singh, G. y Sekar, V. (2002). Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity. *J Appl Microbiol* 93(5): 772-80.
- Nakamura, L. K. (1994). DNA relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars. *Int J Syst Bacteriol* 44(1): 125-9.

- O'Brien, R. D. y Lindow, S. E. (1989). Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology* 79: 619-27.
- Ohba, M. y Aizawa, K. (1986). Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J Invertebr Pathol* 47(3): 277-82.
- Ohba, M. (1996). *Bacillus thuringiensis* population naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *J Appl Bacteriol* 80: 56-64.
- Ohba, M. y Lee, D. H. (2003). *Bacillus thuringiensis* associated with faeces of the Kerama-jika, *Cervus nippon keramae*, a wild deer indigenous to the Ryukyus, Japan. *J Basic Microbiol* 43(2): 158-62.
- Orduz, S., Rojas, W., Correa, M. M., Montoya, A. E. y de Barjac, H. (1992). A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J Invertebr Pathol* 59(1): 99-103.
- Orduz, S., Diaz, T., Restrepo, N., Patino, M. M. y Tamayo, M. C. (1996). Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91(2): 231-7.
- Padua, L. L., Gabriel, B. P., Aizawa, K. y Ohba, M. (1982). *Bacillus thuringiensis* isolated from the Philippines. *Philipp Entomol* 5: 185-94.
- Pinto, L. M., Azambuja, A. O., Diehl, E. y Fiuza, L. M. (2003). Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). *Braz J Biol* 63(2): 301-6.
- Porcar, M. y Caballero, P. (2000). Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *J Appl Microbiol* 89(2): 309-16.
- Qazi, S. N., Rees, C. E., Mellits, K. H. y Hill, P. J. (2001). Development of gfp vectors for expression in *Listeria monocytogenes* and other low G+C Gram positive bacteria. *Microb Ecol* 41(4): 301-9.
- Quinones, B., Dulla, G. y Lindow, S. E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 18(7): 682-93.
- Raps, A., Kehr, J., Gugerli, P., Moar, W. J., Bigler, F. y Hilbeck, A. (2001). Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Mol Ecol* 10(2): 525-33.
- Raymond, M. (1985). Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-innateur. *Cah. OSTROM, Sér. Ent. Med. et Parasitol.* 22(2): 117-21.

- Rizali, A., Asano, S., Sahara, K., Bando, H., Lay, B. W., Hastowo, S. y Iizuka, T. (1998). Novel *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* strains isolated from mulberry leaves in Indonesia. *Appl Entomol Zool* 33(1): 111-4.
- Romeis, J., Meissle, M. y Bigler, F. (2006). Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat Biotechnol* 24(1): 63-71.
- Sabaratnam, S. y Beattie, G. A. (2003). Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in epiphytic and endophytic colonization of leaves. *Appl Environ Microbiol* 69(2): 1220-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. C. Nolan, Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. y Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(3): 775-806.
- Segura, C., Guzman, F., Patarroyo, M. E. y Orduz, S. (2000). Activation pattern and toxicity of the Cry11Bb1 toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *J Invertebr Pathol* 76(1): 56-62.
- Shelton, A. M., Zhao, J. Z. y Roush, R. T. (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu Rev Entomol* 47: 845-81.
- Shorey, H. H. y Hale, R. L. (1965). Mass-rearing of the larvae of nine Noctuid species on a simple artificial medium. *J Econ Entomol* 58: 522-4.
- Siegel, J. P. (2001). The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J Invertebr Pathol* 77(1): 13-21.
- Smith, R. A. y Couche, G. A. (1991). The pyloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl Environ Microbiol* 57(1): 311-5.
- Thomas, D. J., Morgan, J. A., Whipps, J. M. y Saunders, J. R. (2000). Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Appl Environ Microbiol* 66(1): 118-24.
- Thomas, D. J., Morgan, J. A., Whipps, J. M. y Saunders, J. R. (2001). Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol* 67(1): 330-8.
- Tinoco-Ojanguren, C. y Pearcy, R. W. (1993). Stomatal dynamics and its importance to carbon gain in two rainforest *Piper* species. I. VPD effects on the transient stomatal responses to lightflecks. *Oecologia* 94: 288-94.
- Uribe, D., Martinez, W. y Ceron, J. (2003). Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol* 82(2): 119-27.

- Vaid, A. y Bishop, A. H. (2000). Whole-cell PCR of *Bacillus thuringiensis* recovered from the phylloplane. *J Invertebr Pathol* 76(2): 147-8.
- van Frankenhuyzen, K. (1993). The challenge of *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. P. Entwistle, Ed. London, UK, John Wiley and Sons. pp: 1-35.
- Wei, J. Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S. C. y Aroian, R. V. (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2760-5.
- Whalon, M. E. y Wingerd, B. A. (2003). Bt: mode of action and use. *Arch Insect Biochem Physiol* 54(4): 200-11.
- Williams, K., Field, C. B. y Mooney, H. A. (1989). Relationships among leaf construction cost, leaf longevity, and light environment in rainforest plants in the genus *Piper*. *The American Naturalist* 133: 198-211.
- Wilson, M. y Lindow, S. E. (1992). Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* 58(12): 3908-13.
- Wilson, M. y Lindow, S. E. (1993). Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology* 83: 117-23.
- Wilson, M. y Lindow, S. E. (1994). Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl Environ Microbiol* 60(12): 4468-77.
- Wilson, M., Hirano, S. S. y Lindow, S. E. (1999). Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl Environ Microbiol* 65(4): 1435-43.
- Yara, K., Kunimi, Y. y Iwahana, H. (1997). Comparative studies of growth characteristic and competitive ability in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil. *Appl Entomol Zool* 32: 625-34.
- Zhioua, E., Heyer, K., Browning, M., Ginsberg, H. S. y LeBrun, R. A. (1999). Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 36(6): 900-2.