

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis de cepas presuntivas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de la filosfera del árbol de aguacate utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar genes *cry*

Trabajo de tesis presentado por Francisco Valencia Ávalos para optar al título de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2010

Análisis de cepas presuntivas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de la filosfera del árbol de aguacate utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar genes *cry*

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Análisis de cepas presuntivas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de la filosfera del árbol de aguacate utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar genes *cry*

Trabajo de tesis presentado por Francisco Valencia Ávalos para optar al título de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2010

Vo.Bo.:

(f) _____
Dra. Pamela Marie Pennington
Asesora de Tesis

Tribunal Examinador:

(f) _____
Dra. Pamela Marie Pennington
Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología

(f) _____
Ing. Carlos Rolz Asturias

(f) _____
Lda. Maricruz Álvarez Mury

Fecha de aprobación: Guatemala 8 de Junio del 2010.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por haberme dado el incondicional apoyo para estudiar esta carrera y haberme ayudado en todo lo posible para llegar hasta donde estoy.

Agradezco a mi muy buena amiga Vera por la ayuda con la tesis y por su apoyo en todo momento.

También quiero agradecer a mi asesora de tesis, la Dra. Pamela Pennington, por su incomparable ayuda y guía durante la realización de mi tesis y por haberme dado la oportunidad de participar en el proyecto.

A Willy Juárez por su invaluable apoyo en el laboratorio, sobre todo para la realización de los SDS-PAGE.

Y finalmente quiero agradecer a todas esas personas que de alguna manera u otra me han inspirado a continuar con mis estudios y terminar esta tesis.

	CONTENIDO	Página
	AGRADECIMIENTOS	v
	LISTA DE CUADROS	vii
	LISTA DE FIGURAS	viii
	RESUMEN	ix
	ABSTRACT	x
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	2
III.	ANTECEDENTES	3
IV.	OBJETIVOS	22
V.	JUSTIFICACIÓN	23
VI.	MÉTODOS	24
VII.	RESULTADOS	51
VIII.	DISCUSIÓN	63
IX.	CONCLUSIONES	67
X.	RECOMENDACIONES	68
XI.	BIBLIOGRAFÍA	69
XII.	ANEXOS	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Orden y reactivos de PCR para cebadores OL1F/OL5R.	30
2. Programa para PCR para amplificación con cebadores OL1F/OL5R	30
3. Orden y reactivos de PCR para tamizaje de células transformadas con cebadores M13/pUC	38
4. Programa para PCR de tamizaje con cebadores M13/pUC	38
5. Concentraciones y purezas de las muestras de ADN de <i>Bacillus thuringiensis</i> extraído con dos kits comerciales y el método modificado de Chelex.	51
6. Productos de PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R ligados que fueron secuenciados.	55
7. Divergencias evolutivas calculadas para las distintas cepas seleccionadas con otras especies del género <i>Bacillus</i> y cepas conocidas de <i>B. thuringiensis</i> utilizando los nucleótidos del gen de una subunidad de la ADN Polimerasa III.	57
8. Divergencias evolutivas calculadas para las distintas cepas seleccionadas con otras especies del género <i>Bacillus</i> y cepas conocidas de <i>B. thuringiensis</i> utilizando la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen de una subunidad de la ADN Polimerasa III.	57
9. Divergencias evolutivas calculadas para las distintas cepas seleccionadas con otras especies del género <i>Bacillus</i> y cepas conocidas de <i>B. thuringiensis</i> utilizando los nucleótidos del gen de la Alcohol Deshidrogenasa.	58
10. Divergencias evolutivas calculadas para las distintas cepas seleccionadas con otras especies del género <i>Bacillus</i> y cepas conocidas de <i>B. thuringiensis</i> utilizando la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen de la Alcohol Deshidrogenasa.	59
11. Secuencia consenso de los fragmentos secuenciados. Se indica la cepa de donde se amplificó el fragmento, la identificación del fragmento y el gen con el que mayor tuvieron similitud según la base de datos “nucleotide collection” del NCBI.	77
12. BLASTS correspondientes de cada fragmento secuenciado obtenido de las distintas cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> aisladas.	79

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Micrografía electrónica de <i>B. thuringiensis</i> subespecie <i>thuringiensis</i> berliner 1715 durante esporulación.	5
2. Actividad de β -Galactosidasa de cepas de <i>B. thuringiensis</i> con fusiones cryIAa'-lacZ cryIAa'-lacZ y cryIIIa'-lacZ.	6
3. Patrones de mutaciones puntuales de una región del gen del ARNr 16S de las cepas presuntivas de <i>B. thuringiensis</i> utilizadas en este estudio.	20
4. Gram de frote de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	51
5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R de las 6 cepas utilizadas	52
6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR de la amplificación utilizando los cebadores OL1F/OL5R de la cepa 1S22.	53
7. Bacterias <i>E. coli</i> transformadas plaqueadas en cuadrilla en presencia de IPTG y X-Gal.	54
8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR del tamizaje por utilizando cebadores M13/pUC de 30 bacterias <i>E. coli</i> transformadas con insertos pertenecientes a la amplificación utilizando cebadores OL1F/OL5R de la cepa 1S22.	54
9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR del tamizaje utilizando cebadores universales M13/pUC de bacterias <i>E. coli</i> transformadas con insertos de interés de la amplificación utilizando los cebadores OL1F/OL5R de cepas 10S21 y 3S24.	55
10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.6% de los plásmidos de las bacterias transformadas para determinar el tamaño de los insertos.	55
11. Relaciones filogenéticas entre 2 especies de <i>Bacillus thuringiensis</i> aisladas de la filosfera del árbol de aguacate con respecto a otras dos cepas de <i>B. thuringiensis</i> y cepas de <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> y <i>B. weihenstephanensis</i> utilizando el gen de la ADN polimerasa III.	57
12. Relaciones filogenéticas entre 3 especies de <i>Bacillus thuringiensis</i> aisladas de la filosfera del árbol de aguacate con respecto a otras dos cepas de <i>B. thuringiensis</i> y cepas de <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> utilizando una porción del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa.	59
13. SDS-PAGE de las 6 cepas analizadas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	61

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva con la habilidad de iniciar un proceso de esporulación en condiciones de desarrollo adversas. Las esporas de la bacteria tienen una actividad entomopatógena sobre insectos de determinada orden y familia, siendo distintas cepas más tóxicas que otras en ciertos insectos. Esto se debe a la síntesis de proteínas con actividad tóxica, durante la esporulación, denominadas Cry y Cyt. El objetivo principal del estudio era el de realizar un análisis de cepas presuntivas seleccionadas de *B. thuringiensis* aisladas de la filosfera del árbol de aguacate para la presencia de genes *cry*. Entre los específicos se encontraban clonar los fragmentos obtenidos de la amplificación por PCR, analizar el patrón de proteínas y plásmidos de las distintas cepas seleccionadas. El estudio consistió en una amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos anteriormente mencionados en seis diferentes cepas. Luego, se clonaron los fragmentos amplificados utilizando un vector de clonación que fue electroporado a células *E. coli*. Las células que presentaban insertos de distinto tamaño fueron cultivadas y se les realizó una extracción de plásmidos los cuales fueron posteriormente secuenciados. Además, se separaron las proteínas de las distintas cepas por un SDS-PAGE y se realizó una separación por electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos extraídos de las distintas cepas. Las secuencias obtenidas de diferentes cepas mostraban alta similitud con secuencias de genes que codifican una subunidad de la ADN polimerasa III y alcohol deshidrogenasa de varias especies del género *Bacillus*. Se realizó un análisis filogenético utilizando estas secuencias y se determinó la relación evolutiva de las cepas analizadas con respecto a otras especies del género *Bacillus*. Además, una de las secuencias obtenidas demostraba alta similitud con la del plásmido pALH1, únicamente reportado *B. thuringiensis* Al Hakam. La identificación de genes *cry* de las cepas no se pudo realizar debido a que los genes no fueron amplificados con los cebadores y condiciones utilizadas para el PCR.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram positive bacteria with the ability of initiating a sporulation process in adverse development conditions. The bacterial spores have an entomopathogenic activity in insects of specific order and family, being some strains more toxic than others for some insects. This is because of the synthesis of protein with toxic activity during sporulation called Cry and Cyt. The main objective of the study was to carry out an analysis of selected presumptive strains of *B. thuringiensis* isolated from the phyllosphere of the avocado tree for the presence of *cry* genes. The specific objectives were to clone the amplified fragments obtained via PCR, and to analyze the pattern of proteins and plasmids of the selected strains. The methodology was to amplify different fragments of the genome of the strains using PCR with degenerate primers directed to consensus sequences of various *cry* genes. Then, the fragments were ligated into a cloning vector and electroporated into *E. coli* cells. Selected cells were grown and the plasmids were extracted and sequenced. Also, the proteins were analyzed via SDS-PAGE and the extracted plasmids were separated by electrophoresis in an agarose gel. The obtained sequences showed high similarity with the genes of a subunit of the DNA polymerase III and alcohol dehydrogenase of several species of the *Bacillus* genus. The phylogenetic analysis was carried out using this sequences and the relationship of the selected strains and different species of the *Bacillus* genus was determined. Also, an obtained sequence showed high similarity with one of the pALH1 plasmid, reported only in *B. thuringiensis* Al Hakam. The identification of the *cry* genes codified in the bacteria was unsuccessful because the genes were not amplified with the primers and conditions used for the PCR.

I.INTRODUCCIÓN

El uso de pesticidas químicos altera la ecología natural de un área al eliminar tanto al insecto plaga como a las especies que habitan el lugar donde se aplica el tratamiento. Además contamina suelos y agua con compuestos químicos que pueden ser, incluso, tóxicos para el ser humano.

Bacillus thuringiensis ha sido utilizado por más de 30 años como un biopesticida seguro y específico que elimina únicamente el insecto plaga. Además es biodegradable por lo que se descarta la contaminación ambiental. Su actividad entomopatogénica consiste en la síntesis de proteínas tóxicas para los insectos denominadas Cry y Cyt. Las proteínas están codificadas por una familia de genes. Existen distintos tipos de genes que codifican proteínas con actividad tóxica hacia distintas familias de insectos.

El descubrimiento de nuevos genes *cry* es de alta importancia debido a que se ha reportado la aparición de resistencia hacia las toxinas por varios insectos. Esto ayuda al control de plagas que han generado resistencia y nuevas plagas contra las cuales aun no se ha descubierto proteínas tóxicas.

Las cepas analizadas en el estudio fueron previamente aisladas y categorizadas por medio de un análisis del ADN ribosomal 16S (Roche 2008). Se realizó un PCR utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar genes *cry*. Los fragmentos obtenidos fueron clonados y secuenciados.

Se hizo un análisis de las distintas cepas utilizando las secuencias obtenidas y se determinó la relación evolutiva de las cepas con respecto a otras especies del género *Bacillus* y otras cepas de *B. thuringiensis*.

II.HIPÓTESIS

Diferentes cepas presuntivas de *B. thuringiensis* aisladas de la filoesfera del árbol de aguacate están filogenéticamente relacionadas con cepas conocidas de *B. thuringiensis*.

II.ANTECEDENTES

A. Historia

B. thuringiensis (Bt) fue descrito por primera vez en 1911 por Berliner cuando aisló un especie de *Bacillus* de la polilla mediterránea de la harina, *Anagasta kuehniella*, y la nombró así por la provincia de Thuringia en Alemania donde la polilla infectada fue encontrada. Aunque fue la primera descripción bajo el nombre de *B. thuringiensis*, no fue el primer aislamiento. En 1901, el biólogo japonés Ishiwata Shigetane, descubrió a una bacteria no descrita previamente como agente causal de enfermedad en gusanos de seda (Roh *et al.* 2007).

B. thuringiensis fue originalmente considerada como un riesgo para el gusano de seda pero se ha convertido en el corazón del control biológico de plagas. La primera producción comercial inició en Francia en 1938 bajo el nombre de Sporeine. Un resurgimiento del interés en *B. thuringiensis* ha sido atribuido a Edward Steinhaus que obtuvo un cultivo en 1942 y atrajo atención al potencial del *B. thuringiensis* a través de estudios subsecuentes. En 1956, T. Angus demostró que inclusiones proteicas cristalinas que se forman durante la esporulación eran responsables de la actividad insecticida del *B. thuringiensis*. Al principio de los ochentas, Gonzáles *et al.*, revelaron que los genes que codificaban para estas proteínas se localizaban en plásmidos transmisibles y Schnepf y Whiteley clonaron y caracterizaron por primera vez los genes codificantes, para las proteínas que tenían un efecto tóxico en la larva del gusano de cuerno del tabaco, de ADN de un plásmido de *B. thuringiensis* subespecie *kurstaki* HD-1 (Roh *et al.* 2007).

B. *Bacillus thuringiensis*

Los miembros del género *Bacillus* son ampliamente conocidos como fuentes de enzimas industriales, bioquímicos de alta calidad, antibióticos e insecticidas. Una de las especies, *B. thuringiensis*, es fuente del 90% de los biopesticidas utilizados en la actualidad. Las propiedades entomopatogénicas de esta bacteria se debe en parte a la producción de δ -endotoxinas que conforman una inclusión cristalina característica de las cepas de *B. thuringiensis* (Agaisse *et al.* 1995).

B. thuringiensis es una bacteria Gram-positiva que se caracteriza por la producción de proteínas en cristales con actividad insecticida (proteínas Cry o δ -endotoxinas que son codificadas por genes *cry*) (Berón *et al.* 2005). *B. thuringiensis* ha sido utilizado como un insecticida biológico exitoso por más de 40 años y es particularmente específico, seguro y efectivo para el control de una gran variedad de insectos (Berón *et al.* 2005). Las toxinas Cry constituyen una familia de proteínas relacionadas que pueden matar insectos pertenecientes a Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera y Mallophaga, así como otros invertebrados (Feitelson *et al.* 1999). La incorporación de genes *cry* a cultivos importantes, proveyendo plantas resistentes a insectos, es una de las aplicaciones más recientes a la agricultura de *B. thuringiensis* (Berón *et al.* 2005).

En 1989, Höfte y Whitley propusieron una clasificación para las δ -endotoxinas (Höfte *et al.* 1989). Ellos distinguieron cuatro grandes tipos de δ -endotoxinas (CryI, -II, -III y -IV) y citolisinas (Cyt), encontradas en los cristales de las cepas con actividad tóxica hacia mosquitos, en base a su actividad insecticida y propiedades moleculares. Las δ -endotoxinas pertenecientes a estas clases fueron agrupadas en subclases (A, B, C.... y a, b, c.....) dependiendo su secuencia. Generalmente, estas proteínas son tóxicas para lepidópteros (CryI), lepidópteros y dípteros (CryII), coleópteros (CryIII) y dípteros (CryIV) (Agaisse *et al.* 1995).

Los cristales están compuestos de proteínas Cry y Cyt, en diferentes combinaciones y proporciones. A la fecha, estas proteínas han sido clasificadas en 49 grupos Cry y 2 grupos Cyt, y en diferentes subgrupos dependiendo de la homología de la secuencia de aminoácidos. (Ruiz *et al.* 2006).

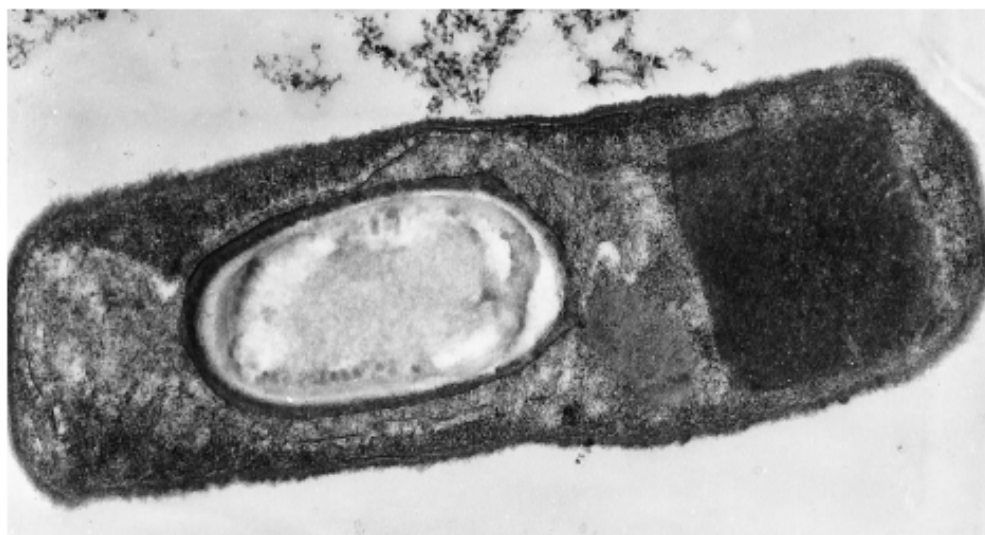
Las proteínas insecticidas son sintetizadas durante la fase estacionaria de la curva de crecimiento y se acumulan en la célula madre como una inclusión cristalina que representa el 25% del peso seco de las células esporuladas (Figura 1) (Agaisse *et al.* 1995).

La formación de cristales involucra la acumulación de proteínas tóxicas. *B. thuringiensis* forma inclusiones de proteínas Cry en cultivos de fase estacionaria, expresando un gen con un fuerte promotor en una célula que no se divide. De esta manera la proteína no se diluye por la división celular (Agaisse *et al.* 1995).

La necesidad de proteínas Cry nuevas con una potencial tóxica en contra de diferentes organismos con especificidad para un rango mucho mayor de plagas ha resultado en la búsqueda

de nuevos acercamientos experimentales para expandir el rango de huéspedes de las cepas disponibles (Crickmore *et al.* 2002).

Figura 1. Micrografía electrónica de *B. thuringiensis* subespecie *thuringiensis* berliner 1715 durante esporulación. La inclusión oscuro paraesporal es el cristal insecticida.



(Berón 2005).

C. Genes *cry* y *cyt*:

La mayoría de los genes *cry* codifican para δ -endotoxinas. Estas toxinas fueron originalmente clasificadas en cuatro clases de acuerdo su homología de secuencia y especificidades insecticidas. (Roh *et al.* 2007).

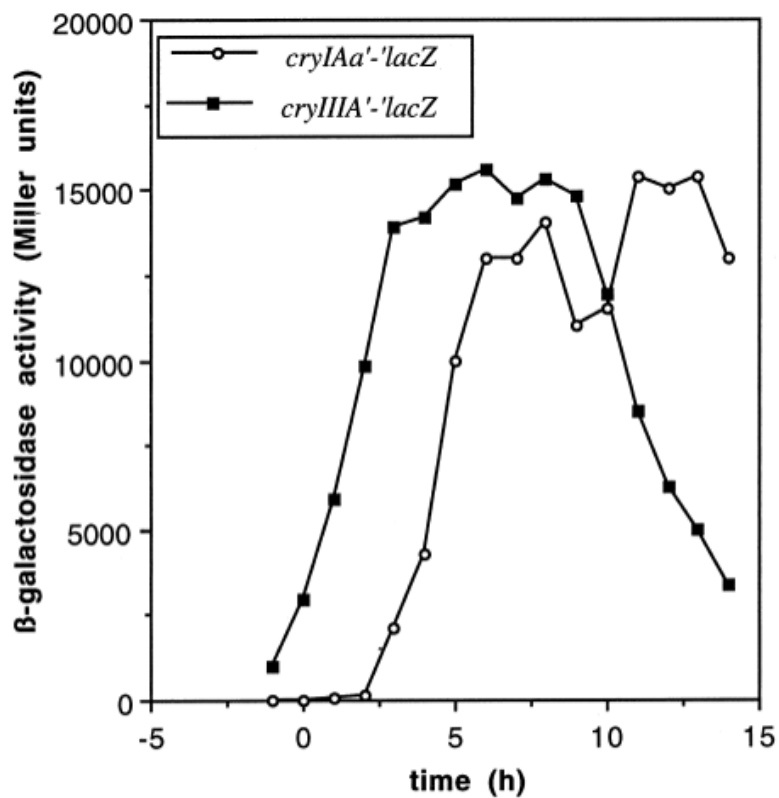
Las cepas de *Bacillus* han evolucionado al menos dos distintas vías en respuesta a estrés nutritivo: un período semiconsiente no divisor y un programa de desarrollo para formación de una espora. Por esto es conveniente distinguir entre los genes que son dependientes y no dependientes de la esporulación (Agaisse *et al.* 1995).

En las especies de *Bacillus*, la endospora se desarrolla en un esporangio que consiste en dos compartimentos celulares conocidos como célula madre y forespora (Agaisse *et al.* 1995). En *B. subtilis*, las etapas de desarrollo están reguladas por la activación sucesiva de seis factores sigma que, al unirse a la ARN polimerasa, determinan que promotores de genes son reconocidos (Helmann *et al.* 1988). De estos factores, el factor σ^A es el principal factor sigma en células

vegetativas. Los factores σ^E y σ^K están activos en la célula madre al momento de la esporulación (Agaisse *et al.* 1995).

El gen *cryIA* es un típico ejemplo de un gen que únicamente está activo en la célula madre al momento de la esporulación. Dos sitios iniciales de la transcripción que se traslapan (definidos como BtI y BtII) han sido secuenciados (Wong *et al.* 1983). BtI está activo de 2 a 6 horas después de la esporulación y BtII está de 5 horas en adelante. Experimentos *in vitro* han demostrado que la transcripción desde BtI está iniciada por una ARN polimerasa que contiene un factor sigma alternativo, σ^{35} (Brown *et al.* 1988), mientras que la transcripción desde BtII está iniciada por una ARN polimerasa que contiene otro factor sigma alternativo, σ^{28} (Brown *et al.* 1990). Los genes que codifican para σ^{35} y σ^{28} han sido clonados y secuenciados. Su secuencia deducida de aminoácidos demuestra una similitud de 88 y 85% a σ^E y σ^K de *B. subtilis*, respectivamente (Adams *et al.* 1991).

Figura 2. Actividad de β -Galactosidasa de cepas de *B. thuringiensis* con fusiones *cryIAa'*-*lacZ* y *cryIIIA'*-*lacZ*. Células de *B. thuringiensis* fueron cultivadas en medio SP a 30°C. El tiempo cero (t_0) indica el inicio de la fase estacionaria. t_n es el número de horas antes (-) o después del tiempo cero



(Agaisse 1995).

Mutantes de *B. thuringiensis* fueron construidos y la actividad promotora de *cryIAa* fue monitoreada por una fusión transcripcional de *cryIAa'*-*lacZ*. Se demostró que mutantes para σ^K manifestaban una actividad menor de β -galactosidasa (alrededor del 50%) y mutantes para σ^E la síntesis de β -galactosidasa era completamente abolida. La expresión de β -galactosidasa por la fusión *cryIAa'*-*lacZ* en *B. thuringiensis* es muy alta, sugiriendo que los promotores involucrados en la expresión de *cryIAa* son muy fuertes (Figura 2) (Agaisse *et al.* 1995).

El gen *cryIIIa* es un típico ejemplo de un gen *cry* no dependiente de la esporulación. Se ha demostrado que la cinética de expresión de *cryIAa* y *cryIIIa* es diferente (Figura 2). El promotor de *cryIIIa* es leve pero significativamente expresado durante la fase vegetativa de crecimiento (a diferencia de los promotores de *cryIAa*), es activado al final del crecimiento exponencial y se mantiene activo hasta 8 horas después en un medio de esporulación. A diferencia de BtI y BtII, el promotor de *cryIIIa* es similar al promotor reconocido por el principal factor sigma de las células vegetativa, σ_A . La expresión de *cryIIIa* es no dependiente de los factores sigma específicos de la esporulación tanto en *B. subtilis* como en *B. thuringiensis*. Además, se ha demostrado que durante la esporulación un evento desactiva la expresión de *CryIIIa* (Agaisse *et al.* 1995).

Los genes *cry* se encuentran en plásmidos y muchas de las cepas de *B. thuringiensis* contienen varios genes *cry* diferentes. Se ha demostrado que cepas de *B. thuringiensis* que únicamente contienen una copia de un gen *cry* (por ejemplo, *cryI* en la subespecie *kurstaki* HD73) sintetizan cristales que no son significativamente más pequeños que las cepas que contienen tres o cuatro genes *cry*. Debido a lo anterior, al parecer la producción de toxinas en *B. thuringiensis* no es proporcional a la cantidad de copias de genes *cry*. Esto sugiere que la capacidad de síntesis de cristales de proteínas está limitada (aunque en un nivel alto) (Agaisse *et al.* 1995).

Glatron y Rapoport demostraron que los ARNm codificantes para las proteínas de los cristales en *B. thuringiensis* están entre los ARNm de vida media más larga. La vida media de un ARNm codificante para estas proteínas es de alrededor de 10 minutos (Glatron *et al.* 1972).

Se cree que la estabilidad de estos ARNm se deben a estructuras terminales en los lados 3' y 5' de la molécula. Se ha demostrado que fragmentos terminales 3' del ARNm del gen *cryIAa* de *B. thuringiensis* incrementan la vida media de la molécula al formar una estructura en forma de círculo que protege al ARN de degradación exonucleótica desde el lado 3' (Wong *et al.* 1986). La

región 5' actúa como un estabilizador. Se ha determinado que la estabilidad del ARNm del gen *cryIII A* la confiere una secuencia consenso Shine-Dalgarno (SD). Análisis de mutaciones en esta región sugieren que la secuencia SD involucrada en la estabilidad lo hace por medio de interacciones con el extremo 3' del ARNr 16S. Por lo tanto, la unión de la subunidad 30S ribosomal con la secuencia SD localizada en la parte no traduccional 5' del gen *cryIII A* estabiliza el correspondiente transcrito (Hue *et al.* 1995).

D. Proteínas Cry y Cyt

Las proteínas Cry son definidas como proteínas de inclusión paraesporal de *B. thuringiensis* que exhiben un efecto tóxico al organismo blanco, o cualquier proteína que tiene una secuencia similar a una proteína Cry conocida. Las toxinas Cyt están incluidas en esta definición. (Bravo *et al.* 2007).

Las proteínas Cry y Cyt son toxinas que pertenecen a una clase de toxinas bacterianas conocidas como toxinas formadoras de poro (PFT) que son secretadas como proteínas solubles en agua y sufren cambios conformacionales para insertarse en la membrana celular de su huésped. (Bravo *et al.* 2007).

Las especies de *Bacillus* producen una gran cantidad en enzimas proteolíticas, especialmente durante la fase estacionaria. *B. thuringiensis* no escapa a esta característica genérica y, por lo tanto, deben contar con mecanismos para evitar la proteólisis prematura de las toxinas. *B. thuringiensis* produce cuerpos de inclusión resistentes a proteasas. Sin embargo, estas inclusiones proteicas deben de ser fácilmente solubilizadas en el intestino del insecto para que sean tóxicas. La formación de estas estructuras cristalinas y las características de solubilidad aparentemente dependen de varios factores, incluyendo la estructura secundaria las proteínas Cry, la energía de los enlaces disulfuro y la presencia de componentes adicionales (Agaisse *et al.* 1995).

La expresión de varios genes *cryI* en *E. coli* y *B. subtilis* conllevan a la síntesis de inclusiones biológicamente activas, sugiriendo que las proteínas CryI pueden formar espontáneamente cristales independientemente de la bacteria huésped. Las regiones C-terminales de las proteínas CryI, CryIVA y CryIVB son similares, por lo que se cree que su cristalización es

similar. La región C-terminal es rica en cisteínas y no está involucrada en la toxicidad. Es por esto que generalmente se asume que esta región contribuye a la estabilidad del cristal por medio de la formación de puentes disulfuro (Agaisse *et al.* 1995).

La cristalización de la proteína de 73-kDa CryIIIa es un poco diferente. La diferencia entra las características de solubilidad de cristales CryI y CryIIIa es probablemente debido a la ausencia de la región C-terminal rica en cisteínas de las protoxinas CryIIIa. Los cristales de CryIIIa están compuestos de polipéptidos que no parecen estar unidos por puentes disulfuro (Bernhard *et al.* 1986). Análisis de la estructura tridimensional de la proteínas CryIIIa sugiere que cuatro puentes de sal intramoleculares están implicados en la formación de la inclusión cristalina (Li *et al.* 1991).

Hay varias evidencias que la cristalización de proteínas CryIIa, CryIVd y CytA es por medio de un mecanismo distinto y necesita de proteínas accesorio (Agaisse *et al.* 1995).

En los últimos 20 años, más de 300 diferentes proteínas Cry y Cyt han sido identificadas, y varias de ellas han sido utilizadas con éxito como insecticidas biológicos en programas de manejo integrado de plagas. Generalmente los cristales están compuestos de protoxinas de 130 a 140 kDa (correspondientes a la expresión de los genes *cryI*), 65 a 70 kDa (de los genes *cryII*) y 70 a 130 kDa (de los genes *cryIII*). Sin embargo, no todas las proteínas insecticidas producidas por *B. thuringiensis* se agrupan en cristales. Algunas cepas de *B. thuringiensis* secretan proteínas insecticidas durante su fase de crecimiento vegetativo las cuales son llamadas proteínas VIP (Ruiz *et al.* 2006).

E. Modo de acción de las proteínas Cry

Las protoxinas Cry al ser ingeridas por la larva de insecto susceptible son proteolíticamente digeridas para liberar los fragmentos tóxicos. Durante la activación proteolítica, péptidos son removidos de los extremos amino- y carboxi-terminal de la protoxina. Un modelo generalmente aceptado para la acción de las toxinas cry es que es un proceso de varias etapas. Primero, la toxina activa se adhiere a los receptores localizados en la membrana del microvello apical del epitelio de las células de intestino. Después de que la toxina se ha adherido al receptor, se piensa que sufre un cambio conformacional, permitiendo que la toxina se inserte en la membrana. Luego sucede una oligomerización de la toxina. Este oligómero forma un poro que provoca lisis celular por osmosis (Roh *et al.* 2007).

Como se mencionó previamente, es aceptado que la acción primaria de las toxinas Cry es la de lisar las células epiteliales del intestino del insecto blanco y de formar poros en el microvello apical de las células. Sin embargo, se ha sugerido recientemente que la toxicidad puede estar relacionada a la apoptosis mediada por proteína-G después del enlace al receptor (Bravo *et al.* 2007).

La lisis celular y de la disrupción del epitelio del intestino provocan la liberación del contenido celular lo cual provee a las esporas un medio germinador induciendo una severa septicemia y muerte del insecto (Bravo *et al.* 2007).

F. Uso del *B. thuringiensis* para control biológico de plagas

Se han logrado tres aplicaciones principales de las toxinas de *B. thuringiensis*: (i) en el control de pestes defoliadoras en bosques, (ii) en el control de mosquitos que son vectores de enfermedades humanas y (iii) en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a insectos (Bravo *et al.* 2007).

Productos insecticidas de *B. thuringiensis* fueron comercializados por primera vez en Francia a finales de los años 30. Por más de 60 años, *B. thuringiensis* ha sido uno de los biopesticidas más consistentes y significantes para el uso en cosechas como un insecticida en spray, el cual contiene una mezcla de esporas y cristales insecticidas. Para 1995, 182 productos basados en *B. thuringiensis* estaban registrados en la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (EPA), pero en 1999 formulaciones de *B. thuringiensis* constituían menos del dos por ciento del total de las ventas de insecticidas y representaban el 80% de todos los biopesticidas vendidos. El uso de *B. thuringiensis* ha incrementado debido a la resistencia de pestes de insectos hacia los insecticidas químicos (Roh *et al.* 2007).

El uso intensivo de insecticidas basados en *B. thuringiensis* ha provocado resistencia en poblaciones de la palomilla dorso de diamante, *Plutella xylostella*. Debido a que cosechas transgénicas de *B. thuringiensis* generalmente expresan uno o dos tipos de proteínas Cry, el desarrollo de resistencia de pestes es visto como una amenaza grande para esta tecnología. La búsqueda de nuevas cepas de *B. thuringiensis* que contengan nuevos genes *cry* ha sido concebida con considerable atención en las últimas dos décadas, no solo para encontrar toxinas con nuevos

espectros de actividad sino también para incrementar el arsenal de toxinas que pueden ser utilizadas para el manejo de resistencias (Ruiz *et al.* 2006).

G. Especies procariotas.

Desde el principio de los años 1970, las especies procariotas han sido delineadas en base a la información generada en experimentos de hibridación ADN-ADN (DDH). Con este procedimiento, la similitud genética general de un aislado es evaluada por el grado en que el genoma se hibridiza bajo ciertas condiciones estandarizadas. La similitud en el contenido de genes y la similitud de nucleótidos de genes compartidos contribuyen en el grado de semejanza entre genomas. Los aislados que muestran valores DDH mayores al 70% y una diferencia menor del 5% en la temperatura de fusión (T_m) se considera que pertenecen a la misma especie. Mientras tanto, las especies que muestran valores menores del 50% de DDH definitivamente pertenecen a especies distintas. Para facilitar la identificación, características fenotípicas consistentes y diferentes entre especies son requeridas (Gevers *et al* 2005).

Sin embargo, el DDH tiene limitaciones serias: es un procedimiento que lleva mucho tiempo y es llevado a cabo de forma correcta en pocos laboratorios. Además, no está disponible para procariotas que no son cultivables y la clasificación por DDH requiere de una comparación entre dos genomas procarióticos y cepas individuales no pueden ser analizadas ni comparadas con una base de datos. No se tiene una teoría ecológica ni evolutiva de cómo se deberían de demarcar especies en base a la similitud de genes entre organismos. La recomendación de separar una especie utilizando el criterio del 70% de DDH no corresponde a un concepto basado de teorías si no que de una calibración empírica que daba como resultado la separación de varias especies definidas por fenotipo al momento de la propuesta (Cohan 2002).

Análisis comparativo de la secuencia del gen del ARN Ribosomal 16S es ampliamente utilizado para determinar la posición filogenética de aislados nuevos. La secuencia del gen del ARNr permite la clasificación de procariotas utilizando una característica distribuida universalmente. Las cepas que muestran una secuencia con una similitud menor al 97% de todas las especies conocidas se considera que pertenece a una nueva especie. Lo anterior debido a que no se conoce ninguna cepa en la que una mayor divergencia en la secuencia de este gen cumpla con el criterio del 70% de DDH (Gevers *et al* 2005).

Aunque las ventajas de la genotipificación directa son claras, la clasificación utilizando únicamente la secuencia del gen de ARNr (un práctica muy común) no es satisfactoria por varias razones. La secuencia del gen de ARNr por regular tiene poca resolución al ser comparada con la DDH (Gevers *et al* 2005). Mientras que aislados que tienen una similitud menor del 97% en la secuencia del gen del ARNr por lo regular tiene un valor de menor del 70% de DDH y pertenecen a una especie diferente, aislados que tienen una similitud mayor al 97% pueden o no cumplir el criterio del 70% de DDH para ser incluidos en la misma especie (Fox *et al* 1992). Consecuentemente, la similitud casi idéntica de la secuencia del gen del ARNr no elimina la necesidad de aplicar otros métodos para explorar si los aislados son lo suficientemente similar para ser asignados a la misma especie (Gevers *et al* 2005).

Las especies procariotas se definen como “una categoría que circunscribe a grupo genómicamente coherente de cepas/aislados individuales que comparten un alto grado de similitud en características independiente, comparables bajo pruebas en condiciones altamente estandarizadas” (Stackebrandt *et al* 2002).

Prácticamente, una especie procariota se considera un grupo de cepas (incluyendo la cepa tipo) que se caracteriza por cierto grado de consistencia fenotípica, mostrando 70% de DDH y más del 97% de similitud con el gen del ARN ribosomal 16S (Vandamme *et al* 1996).

En la práctica, la caracterización taxonómica de una colección de aislados se inicia con un tamizaje que permite que los aislados que están más relacionados sean agrupados para poder ser distinguidos de aislados no relacionados. Los métodos que normalmente se utilizan para tamizar son un análisis de ácidos grasos y una gran cantidad de métodos de tipificación con ADN, entre los cuales se incluye, el polimorfismo por tamaño de fragmento o la utilización de métodos basados en PCR utilizando cebadores degenerados (Gevers *et al* 2005).

H. *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus cereus, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus anthracis* son bacteria Gram positivo, en forma de bastón, espora formadoras que se les conoce como bacilo grupo 1. *B. cereus* y *B. thuringiensis* se encuentran en hábitats de suelo y tiene mucha importancia económica. *B. cereus* puede ser patogénico y puede causar intoxicación alimenticia, infecciones de ojo y enfermedades periodontales en humanos. Preparaciones de toxinas y esporas de *B. thuringiensis* son utilizadas

como insecticidas comerciales. *B. anthracis* es un patógeno de mamíferos muy virulento que es el agente causal del ántrax (Ticknor *et al* 2001).

La diferenciación entre estas tres especies muy relacionadas fue históricamente realizada con ensayos bioquímicos, serotipificación por flagelo y la presencia de cristales con proteínas tóxicas (Crickmore *et al* 1998). Análisis comparativo del gen del ARNr 16S han demostrado que las tres especies contienen secuencias dentro y adyacentes al gen estructural casi idénticas (Andresen *et al* 1995). Se ha examinado aislados de *B. cereus* y *B. thuringiensis* utilizando electroforesis en campo pulsado y electroforesis de multienzimas. Ninguno de los dos métodos agrupó a las cepas en designaciones de especies reconocidas por lo que se sugirió que *B. cereus* y *B. thuringiensis* se consideraran una misma especie (Carlson *et al* 1996). Esto es consistente con la sugerencia que *B. thuringiensis* es simplemente *B. cereus* con plásmidos que codifican proteínas tóxicas (Baumann *et al* 1984).

Polimorfismos conformacionales de hebra simple del la amplificación del ADNr 16S no permiten discriminar entre el grupo. Factores de virulencia, RFLP y la electroforesis en campo pulsado pueden separar *B. anthracis* de *B. cereus* pero fallan al diferenciar *B. cereus* de *B. thuringiensis*. Debido a lo anterior, se ha propuesto que *B. thuringiensis* y *B. anthracis* sean considerados como una subespecie de *B. cereus* (Ash *et al* 1991).

I. Análisis evolutivo

La sistemática es el estudio de las relaciones evolutivas entre especies. La filogenética es el procedimiento de estimar la esas relaciones basándose en información de especies vivas y extintas. Los filogenetistas utilizan esta información para construir un árbol filogenético (Black 2005).

La distancia es un producto de tasa y tiempo, un tema importante al momento de considerar el largo de las ramas. Por lo tanto, no se puede determinar si una rama corta indica que dos especies aparecieron recientemente o si se aislaron desde hace mucho tiempo si el gen que hemos seleccionado ha estado sometido a una selección intensa y por lo tanto tiene una tasa de sustituciones lenta. De la misma manera, una rama larga puede indicar que dos especies se aislaron hace mucho tiempo si la tasa de sustituciones del gen que se ha elegido es alta (Black 2005).

Algunos filogenetistas han propuesto un modelo de reloj molecular, en el que se asume que las mutaciones ocurren a intervalos fijos y regulares. Bajo esta propuesta del reloj molecular, el largo de las ramas reflejaría estrictamente el tiempo desde la divergencia. Sin embargo, el problema con esta proposición es que la tasa de sustituciones del reloj molecular varía grandemente entre genes y taxa (Black 2005).

J. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una amplificación enzimática mediada por cebadores de una secuencia de ADN específica. El ADN molde contiene una secuencia específica, que puede ser de miles de nucleótidos de largo. Una ADN polimerasa termoestable como la *Taq* ADN polimerasa, cataliza la reacción en la que un exceso de oligonucleótidos (cebadores o primers) y cuatro deoxinucleósidos trifostato (dNTPs) son utilizados para hacer millones de copias de la secuencia deseada (Kolmodin 2002).

El proceso del PCR requiere una serie de repeticiones de tres pasos fundamentales que se define como un ciclo de PCR: la desnaturalización de ADN templado de doble hebra, la hibridización de dos cebadores oligonucleótidos al templado de hebra simple y una extensión enzimática para producir copias que pueden servir como templado para ciclos subsecuentes. Con cada ciclo que se lleva a cabo, tanto el templado original como las copias pueden servir de sustrato para la desnaturalización, hibridización de los cebadores y la extensión. Debido a que cada ciclo duplica la cantidad de copias, sucede una amplificación geométrica. Debido a lo anterior, 25 ciclos deberían de producir 33 millones de copias (Kolmodin 2002).

El paso de la desnaturalización ocurre rápidamente de 94 a 96°C. La hibridización de los cebadores depende de la temperatura de fusión (T_m). Por lo general, se utilizan software de computadora para predecir el T_m basándose en la secuencia de los cebadores, las concentraciones utilizadas y la concentración de sales. La mejor temperatura de hibridización se determina por optimización. La extensión ocurre a 72°C para la mayoría de los templados (Kolmodin 2002).

Los cebadores o primers de PCR son oligodeoxiribonucleótidos cortos que están diseñados para ser complementarios a los extremos de las secuencias del amplicón blanco del PCR. Estos ADNs sintéticos normalmente tienen un tamaño de 15-25 nucleótidos y tienen aproximadamente de 50-60% de contenido G+C (Kolmodin 2002).

El cloruro de magnesio es un cofactor esencial para las polimerasas de ADN utilizadas en el PCR y su concentración debe de ser optimizada para cada sistema cebador:templado. Muchos componentes de la reacción se enlazan a los iones de magnesio incluyendo cebadores, templado, productos de PCR y dNTPs. Debido a que es necesario que se encuentre disponible iones de magnesio libres para que se lleve a cabo la reacción, el total de concentración de los iones de magnesio debe de exceder el total de concentración de los dNTPs (Kolmodin 2002).

K. Uso de PCR para la detección de genes *cry*

El PCR es un herramienta que ha sido ampliamente utilizada para la caracterización genes codificantes para proteínas Cry y para el análisis de colecciones de *B. thuringiensis* (Berón *et al.* 2005). Esta técnica fue introducida por primera vez por Carozzi *et al.* (Carozzi *et al.* 1991) para identificar genes *cry* y predecir la actividad insecticida. En la última década, métodos de PCR para la detección de genes *cry* presentes en colecciones de *B. thuringiensis* han sido utilizados para identificar cepas que contienen genes codificantes para tipos de proteínas Cry conocidas (Ben-Dov *et al* 1997, Bourque *et al* 1993, Bravo *et al* 1998, Cerón *et al.* 1995, Ferrandis *et al* 1999, Juárez-Pérez *et al* 1997). Sin embargo, este método es limitado a miembros de las familias previamente descritas y requiere una gran cantidad de cebadores (Berón *et al.* 2005). El éxito modesto de los métodos basados en PCR para la identificación de nuevos genes *cry* se asoció con problemas técnicos relacionados a la complejidad de las cepas multigénicas *cry* (Porcar *et al.* 2003).

Se demostró que la técnica propuesta por Berón *et al.* (Berón *et al.* 2005) es eficiente para la identificación de secuencias *cry* relacionados presentes en aislados de *B. thuringiensis* nuevos. Los primers propuestos tienen ventajas sobre los primers de metodologías anteriores basadas en PCR, que no amplifican genes nuevos que codificaban para grupos de proteínas Cry no descritas (Berón *et al.* 2005).

L. Cuantificación de ADN

Cuando se realiza un experimento para clonar genes es crucial conocer la cantidad de ADN presente en la solución. La concentración de ADN puede ser determinada por espectrofotometría ultravioleta de absorción. La cantidad de radiación UV absorbida por una muestra de ADN es directamente proporcional a la cantidad de ADN en la muestra. Usualmente la

absorbancia se mide a 260 nm, en la que la absorbancia a esa longitud de onda corresponde a 50 μg de ADN de doble hebra por mL (Brown 2001).

La absorbancia también puede ser utilizada para verificar la pureza de la preparación de ADN. Una muestra pura de ADN tiene una tasa de absorbancia a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}) de 1.8. Tasas menores a 1.8 indican una preparación contaminada, ya sea con proteínas o fenol (Brown 2001).

M. Electroforesis en gel

Las moléculas de ADN contienen una carga eléctrica negativa. Cuando las moléculas de ADN son expuestas a un campo eléctrico migran hacia el polo positivo. Un gel, que por lo regular esta hecho de agarosa, poliacrilamida o una mezcla de ambos, se compone de una red compleja de poros, por los que las moléculas ADN deben viajar para alcanzar el electrodo positivo. Entre más pequeña sea una molécula de ADN, mas rápido puede migrar por el gel. La electroforesis en gel separa el ADN en base a su tamaño (Brown 2001).

La composición del gel determina el tamaño de las moléculas de ADN que puede separar. Un gel de agarosa al 0.5% tiene poros relativamente grandes, por lo que puede separar moléculas entre 1 y 30 kb. Por otro lado, un gel de 40% de poliacrilamida tiene poros extremadamente pequeños, por lo que se pueden separar pequeñas moléculas de ADN, entre el rango de 1-300 pb (Brown 2001).

La forma más fácil de visualizar el resultado de una electroforesis es teñir el gel con bromuro de etidio. Las bandas que muestran la posición de los fragmentos de ADN de distinto tamaño son fácilmente visibles bajo luz ultravioleta (Brown 2001).

N. Plásmidos como vectores de clonación

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN que llevan una existencia independientemente en la célula bacteriana. Los plásmidos por lo regular tienen uno o más genes que son responsables de la expresión de una característica útil en la bacteria huésped. Por ejemplo, la habilidad de sobrevivir en concentraciones tóxicas de un antibiótico normalmente se debe a la presencia en la bacteria de un plásmido que tiene el gen de resistencia. La resistencia a antibióticos es utilizada como un marcador de selección para asegurarse que la bacteria contiene un plásmido en particular (Brown 2001). Para evitar que las bacterias de las cuales el plásmido ha

sido eliminado, es importante mantener la presión selectiva incluyendo el antibiótico en el medio de cultivo todo el tiempo (Sambrook 2001).

Todos los plásmidos tienen al menos una secuencia de ADN que actúa como origen de replicación lo que le permite multiplicarse dentro de la célula de una forma independiente del cromosoma de la bacteria (Brown 2001).

O. Clonación de productos de PCR

Una clonación exitosa de fragmentos de ADN provenientes de una reacción en cadena de la polimerasa es un paso clave para el análisis subsecuente del ADN amplificado. Muchos métodos de clonación han sido establecidos. Estos métodos pueden separarse en dos grupos: clonación dependiente de ligación y la clonación independiente de ligación, siendo la primera la de mayor uso. Dependiendo de los extremos del ADN los métodos dependientes de la ligación pueden ser divididos en tres: clonación de extremos romos, clonación de extremos cohesivos y clonación T-A (Guo 2002).

Taq es la polimerasa de ADN termoestable más utilizada y tiene una actividad transferasa terminal. En presencia de los cuatro dNTPs, la deoxiadenosina (dA) es preferiblemente agregada al extremo 3' del ADN amplificado por PCR, dejando un extremo cohesivo de una simple 3' dA. Sin ninguna modificación por una enzima de restricción u otras enzimas, los productos de PCR con extremos cohesivos 3' dA pueden ser directamente clonados a un plásmido linealizado con extremos cohesivos complementarios 5' deoxitimidina (dT) (Guo 2002).

El vector que contiene los extremos cohesivos dT se le conoce como vector-T y el nombre correspondiente a la clonación es clonación T-A. La clonación T-A es una forma de clonación de extremos cohesivos, pero es especial, ya que utiliza únicamente una base como extremo cohesivo (Guo 2002).

La clonación T-A es simple, confiable y más eficiente que la clonación de extremos romos. Mientras se utilicen polimerasas ADN sin actividad 3'-5' exonucleasa, la clonación T-A es aplicable y los productos de PCR pueden no necesitar ningún paso post-PCR. Por lo tanto, la clonación T-A es el método de clonación más utilizado para productos de PCR (Guo 2002).

Aunque no es necesario llevar a cabo ningún procedimiento post-PCR antes de clonar utilizando la clonación T-A, a veces es útil purificar los productos de PCR antes de la ligación

para remover los cebadores debido a que estos se incorporan de forma preferible al vector-T (Guo 2002).

P. Electroporación

La clonación requiere que se introduzca el vector de clonación con el inserto de interés a bacterias competentes para su posterior replicación. El método más eficiente para transformar bacterias es la electroporación. Se piensa que la aplicación de un pulso de electricidad intenso causa depresiones en las membranas celulares seguido por la formación de poros hidrofóbicos con diámetros que fluctúan entre 2 a varios nanómetros. Algunos de los poros hidrofóbicos grandes son convertidos a poros hidrofílicos debido a que la energía necesaria para crear y mantener un poro hidrofílico se reduce mientras el voltaje transmembranario se incrementa. El cierre de los poros parece ser un proceso estocástico que puede ser retrasado al mantener las células a bajas temperaturas. Mientras los poros se mantengan abiertos, las moléculas de ADN pueden pasar fácilmente del medio hacia el citoplasma (Sambrook 2001).

Q. Tamizaje de clones y α -complementación

Muchos plásmidos vectores (incluyendo el pGEM) contienen un pequeño fragmento de ADN de *E. coli* que contiene una secuencia reguladora y la información codificada para los primeros 146 aminoácidos de la β -galactosidasa. Dentro de la región codificante se encuentra un sitio de policlonación que mantiene el marco de lectura y resulta en la interpolación de una pequeña cantidad de aminoácidos en el fragmento amino-terminal de la β -galactosidasa. Los vectores de este tipo son utilizados en huéspedes que expresan la porción carboxi-terminal de la β -galactosidasa. Ninguno de los fragmentos de la enzima tanto del vector como del huésped son activos, pero cuando ambos se unen se forma una proteína enzimáticamente activa (Sambrook 2001).

El tipo de complementación en donde un mutante con una deleción en su segmento operador terminal del gen *lacZ* es complementado por mutantes β -galactosidasa negativos que tienen una región operador-proximal intacta se llama α -complementación (Ullmann *et al.* 1967).

Las bacterias *lac*⁺ que resultan de la α -complementación son fácilmente reconocidas porque forman colonias azules en presencia del sustrato cromogénico X-gal (Horwitz *et al.* 1964, Davies 1968).

Sin embargo, la inserción de un fragmento de ADN ajeno en el sitio de policlonación del plásmido casi siempre resulta en la producción de un fragmento amino-terminal que no es capaz de realizar α -complementación. Por lo tanto, bacterias que tienen el plásmido recombinante forman colonias blancas (Sambrook 2001).

El desarrollo de esta simple prueba de color ha simplificado de gran manera la identificación de vectores recombinantes (Sambrook 2001).

El tamizaje por medio de la α -complementación no es completamente infalible. La inserción de ADN ajeno al vector no siempre desactiva la complementación de la β -galactosidasa. Si el ADN es pequeño (<100 pb) la inserción puede no interrumpir el marco de lectura ni afectar la estructura del fragmento alfa. Además, no todas las colonias blancas tienen plásmidos recombinantes. La mutación o pérdida de la secuencia *lac* puede eliminar la habilidad del plásmido de expresar el fragmento alfa (Sambrook 2001).

R. BLAST

La comparación de secuencias de nucleótidos puede ser utilizada para inferir sobre la función de nuevas secuencias de genes, predecir nuevos miembros de familias de genes y explorar relaciones evolutivas. La herramienta BLAST es la más frecuentemente utilizada para determinar relación entre secuencias. Una vez se han encontrado secuencias similares en la base de datos, la herramienta provee indicadores de qué tan bueno es el alineamiento y si este significa una posible relación biológica o si la similitud entre secuencias es solo una coincidencia. El valor “bit score” es un indicador de que tan bueno es el alineamiento, entre mayor sea el valor mejor el alineamiento. El “E-value” es un indicador de la significancia estadística de un alineamiento en pareja. Entre menor sea el valor hay mas significancia estadística. Por ejemplo, un E-value 0.05 significa que la similitud tiene una probabilidad de 5 en 100 de ocurrir por coincidencia (Anónimo, 2009).

S. Selección de cepas presuntivas de *B. thuringiensis*

Las cepas utilizadas para el estudio fueron previamente aisladas y categorizadas por Roche (2008). Se realizaron dos muestreos, uno en el departamento de Sacatepéquez y otro en Alta Verapaz, Guatemala. Las cepas fueron en fincas de cultivo de aguacate en suelo, hojarasca y follaje. Se obtuvo un total de 296 aislados. Se realizó la prueba de tinción de azul de Coomassie

para determinar si los aislados presentaban inclusiones cristalinas las cuales son características de *B. thuringiensis*. Del total de los aislados obtenidos, 197 fueron considerados cepas presuntivas de *B. thuringiensis* debido a la presencia de inclusiones cristalinas.

Se realizó una extracción de ADN de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* y se llevó a cabo la técnica de polimorfismo conformacionales de hebra simple (SSCP) con los fragmentos amplificados por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores diseñados para amplificar una región del gen del ARNr 16S. Los resultados obtenidos para las muestras obtenidas del muestreo realizado en Alta Verapaz contenían la mayor cantidad perfiles de mutaciones puntuales (Figura 3). Se seleccionaron un total de seis cepas provenientes de suelo de la finca de Alta Verapaz. Cinco de las seis cepas tienen perfiles de mutaciones puntuales distintos (1S22, 3S25, 8S21, 8S22 y 10S21). La sexta cepa fue seleccionada de forma completamente aleatoria (3S24).

Figura 3. Cuadro que muestra el perfil de mutaciones puntuales de las cepas seleccionadas para el estudio. La determinación se realizó por medio de un análisis de SSCP con los fragmentos amplificados por PCR con cebadores diseñados para amplificar una región del gen del ARNr 16S. Las cepas seleccionadas para este estudio están indicadas con una flecha.

Cuadro 15: Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de suelo del segundo muestro en la región 16S del ADN ribosomal.

Muestra	ID	Bandas											
		A6	A5	A4	A3	A2	A1	A0	A	B	C	D	E
Control positivo	Dipel 6106								x	x			x
→	1S22						x	x	x	x			x
	2S22	x	x	x		x	x	x	x	x			x
	2S23					x	x	x	x	x	x	x	x
	2S24							x	x	x	x	x	x
	3S22							x	x	x			x
	3S23		x	x		x		x	x	x		x	x
→	3S25		x	x		x		x	x	x	x	x	x
	4S21							x	x	x	x	x	x
	4S22							x	x	x	x	x	x
	4S23							x	x	x	x	x	x
Suelo	4S24							x	x	x	x	x	x
	4S25							x	x	x	x	x	x
	5S21							x	x	x		x	x
	5S22							x	x	x			x
	5S23							x	x	x	x		x
	6S23							x	x	x	x		x
	6S24							x	x	x	x		x
	7S22							x	x	x	x		x
	7S24							x	x	x	x		x
	7S25							x	x	x	x		x
→	8S21							x	x	x			x
→	8S22				x	x	x	x	x	x			x
	8S23							x	x	x			x
	8S24							x	x	x			x
	8S25							x	x	x			x
	9S21							x	x	x	x	x	x
	9S22							x	x	x			x
	9S23						x	x	x	x			x
	9S24						x	x	x	x			x
→	10S21						x	x	x	x			x
	10S22							x	x	x			x
	10S23							x	x	x	x	x	x
	10S24							x	x	x			x

De acuerdo al marcador molecular 1 Kb INVITROGEN. D y E = 506, 517 pb, C = entre aprox 2036 y 1636 pb, B = 2036 pb y A = entre aprox 2036 y 3054 pb, A0 = 4072 pb, A1 = entre aprox 4072 y 5090 pb, A2 = 5090 pb, A3 = entre aprox 5090 y 6108 pb, A4 = 6108 pb, A5 = entre aprox 6108 y 7106 pb y A6 = 8144 pb.

(Roche, 2008)

La selección se realizó de esta manera partiendo de la suposición que, entre mayor diferencia en el perfil de mutaciones puntuales presentaran las distintas cepas, se detectarían una mayor cantidad genes *cry* en total. Lo anterior debido a que entre mayor diferencia entre las cepas la probabilidad que codificaran genes *cry* diferentes fuera igualmente mayor.

T. Aguacate en Guatemala y plagas

De acuerdo a la información recopilada en el Censo Agropecuario INE-MAGA, que se realizó en Mayo del 2003, se estima que en Guatemala la producción de aguacate alcanza alrededor de 785,500 quintales (MAGA 2005).

Para Guatemala el aguacate significa un rubro importante ya que se estima un área de 2,900 a 3,200 hectáreas con una producción global de 26,000 Toneladas siendo en su mayoría aguacates criollos no seleccionados ya que los registros indican una producción de 5,000 Toneladas de aguacates mejorados en 900 hectáreas, siendo las variedades Hass, Panchoy, Booth 8 y Azteca las más importantes. El costo promedio de producción es de 106 US\$/Tm produciendo un equivalente a 961 empleos permanentes, las exportaciones registradas en el periodo 1993-98 fueron de 3,500 a 4,500 Toneladas métricas/ año, destinándose el 70% a El Salvador y el 27% a Honduras (Vásquez 1999).

Entre los principales insectos plaga del aguacate se encuentran los Thrips, el barrenador de ramas (*Copturus aguacatae*), el barrenador de hueso (*Stenomoma catenifer*), la agalla de la hoja (*Trioza anceps Trthill*), el periquito del aguacate (*Metcalfiella monograma*), el enrollador de la hoja (*Amorbia sp.*) y la araña roja (*Oligonychus sp.*) (Anacafé 2004).

El barrenador de ramas es un coleóptero que ovipostiva en la corteza de ramas y por la gran cantidad de galerías que hacen las larvas al alimentarse de la madera, la rama tiende a romperse perdiéndose por consiguiente la cosecha. Este insecto solo se ha encontrado atacando al aguacate y requiere de éste para su total desarrollo, su distribución se confina a regiones donde existen estos árboles (Coria *et al* 2007).

IV.OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

- Analizar cepas presuntivas de *B. thuringiensis* aisladas de la filosfera del árbol de aguacate para la presencia de genes *cry*.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el método de lisis de la membrana celular (mecánico, químico o por calor) que es más efectivo para extraer ADN de los cultivos de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis*.
- Optimizar el PCR para la clonación de una región de genes *cry* a partir del ADN obtenido de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis*.
- Clonar los productos de PCR obtenidos de la amplificación utilizando cebadores OL1F/OL5R para su posterior secuenciación y análisis de las secuencias de los distintos insertos.
- Analizar el patrón de proteínas de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* por SDS-PAGE.
- Analizar el patrón de plásmidos extraídos de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis*.

V. JUSTIFICACIÓN

El uso de patógenos y sus productos metabólicos para el control de insectos tiene varias ventajas, tales como especificidad, no contaminan el ambiente y no son tóxicos para humanos.

El control microbiológico en la agricultura de plagas ha sido considerado como la alternativa más favorable de insecticidas químicos. *B. thuringiensis* es uno de los microbios más efectivos utilizado como pesticida. Preparaciones de *B. thuringiensis* son utilizadas ampliamente como pesticidas seguros y efectivos en la agricultura y en el control de mosquitos y moscas negras. El uso continuo de pesticidas químicos ha resultado en la aparición de resistencia. Además, el problema de los residuos de los insecticidas en carne y ambiente es un tema preocupante. Por lo tanto, intereses en utilizar alternativas para el manejo de plagas ha ido creciendo con el tiempo (Kati *et al.* 2007),

Guatemala es un país netamente agrícola y esto se ve evidenciado en sus exportaciones. Guatemala cultiva 92,000 quintales anuales de aguacate. Sin embargo, el cultivo es afectado por varias plagas de insectos (Roche 2008). Se deben de buscar nuevas alternativas económicas y no nocivas para el medio ambiente para el control de plagas. *B. thuringiensis* representa una alternativa al control químico de plagas que no contamina el medio ambiente, es selectivo y efectivo.

El tema de investigación es relevante debido a que el control biológico de plagas es una alternativa necesaria para evitar la contaminación de los suelos y agua debido al uso excesivo de pesticidas en Guatemala.

Analizar las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* seleccionadas e identificar los genes *cry* presentes en las distintas cepas será de utilidad para saber la relación que existe entre las cepas aisladas y otras cepas de *B. thuringiensis* y otras especies del género *Bacillus*. Además, se podría predecir la familia de insectos pueden ser afectadas por las toxinas que posiblemente sean expresados por la bacteria.

VI.MÉTODOS

A. Cultivo de cepas presuntivas de *B. thuringiensis*, extracción y cuantificación de ADN.

1. Cultivo de cepas presuntivas de *B. thuringiensis*.

a. Las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* fueron seleccionadas en base a una clasificación anterior por Roche (2008) basándose en ADNr 16S. Se seleccionó cepas que presentaban bandas diferentes en el análisis anteriormente descrito.

1) Equipo y material

- a) Incubadora.
- b) Microscopio.

2) Reactivos a utilizar

- a) Caldo y agar nutritivo.
- b) Reactivos necesarios para la tinción Gram.

3) Procedimiento

- a) Las 6 cepas presuntivas seleccionadas de *B. thuringiensis* fueron retiradas de almacenaje a -80°C en un caldo nutritivo modificado.
- b) Con una pipeta pasteur plástica estéril se recolectó aproximadamente 0.2 mL de cada cepa y el líquido fue inoculado en 5 mL de caldo nutritivo.
- c) En el caso del control positivo Dipel, se tomó una alícuota de 1 mL del producto comercial y se inoculó en 5 mL de caldo nutritivo.
- d) Los caldos fueron incubados 24 horas a 36°C con agitación.
- e) Al finalizar la incubación, una asada de cada caldo fue inoculada en agar nutritivo.
- f) Las cajas con agar nutritivo inoculado fueron incubadas a 36°C durante 24 horas.
- g) Al finalizar la incubación, se realizó una tinción Gram a un frote de cada cepa y se verificó que fueran bacilos Gram Positivos.

2. Extracción de ADN de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* con el kit UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO laboratorios).

a. UltraClean Soil DNA Isolation Kit (laboratorios MO BIO). La extracción de ADN se basa en la lisis celular y una posterior separación de los restos celulares por medio de la adhesión del ADN a una membrana en una columna donde se hace pasar el producto de la lisis celular.

1) Equipo y material:

- a) Columna de purificación (proveído por el kit).
- b) Tubos plásticos estériles de 1.5 mL (proveído por el kit).
- c) Tubos de recolección (proveído por el kit).
- d) Centrifuga (10,000 g).
- e) Micropipetas y puntas (volumen requerido 60 – 900 μ L).

2) Reactivos a utilizar:

- a) Solución S1 a S5 (proveído por el kit).
- b) Agua destilada estéril.

3) Procedimiento:

- a) Se tomó 1 mL de cada caldo nutritivo con cepas presuntivas seleccionadas de *B. thuringiensis* luego de la incubación durante 24 horas a 36°C.
- b) Se centrifugó el caldo a 5000 g durante 5 minutos.
- c) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con 100 μ L de agua destilada estéril.
- d) Se transfirieron los 100 μ L a los tubos de Solución de Balín.
- e) Se agitó suavemente con vortex.
- f) Se agregó 60 μ L de la solución S1 y se invirtieron los tubos varias veces.
- g) Se agregaron 200 μ L de la Solución Removedora de Inhibidores.
- h) Se aseguraron los tubos en un vortex y se agitó con velocidad moderada-rápida durante 10 minutos.
- i) Se centrifugaron los tubos a 10,000 g durante 30 segundos.
- j) Se transfirió el sobrenadante a un tubo plástico estéril de 1.5 mL.

- k) Se agregó 250 μL de la solución S2 y se agitó con vortex durante 5 segundos. Los tubos fueron incubados a 4°C durante 5 minutos.
- l) Los tubos se centrifugaron a 10,000 g durante 1 minuto.
- m) Se transfirieron 450 μL del sobrenadante teniendo cuidado de no perturbar el botón a un tubo plástico estéril de 1.5 mL.
- n) Se agregó 900 μL de la solución S3 y se agitó con vortex durante 5 segundos.
- o) Se transfirieron 700 μL de la solución a una columna de purificación. La columna fue colocada en un tubo recolector y se centrifugó a 10,000 g durante 1 minuto.
- p) Se descartó el líquido en el tubo recolector y se transfirió el resto de la muestra a la columna. Se centrifugó una vez más a 10,000 g durante 1 minuto.
- q) Se agregó 300 μL de la solución S4 y se centrifugó a 10,000 g durante 30 segundos.
- r) Se descartó el líquido en el tubo recolector y se centrifugó una vez más a 10,000 g durante 30 segundos.
- s) Se transfirió la columna a un tubo plástico estéril de 1.5 mL y se agregaron 50 μL de la solución S5.
- t) Se centrifugó a 10,000 g durante 30 segundos.
- u) Se descartó la columna y la solución recolectada que contenía el ADN fue almacenada a -20°C.

3. Extracción de ADN de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* utilizando el kit Fast DNA Spin Kit (for soil) (BIO 101, Inc).

a. Fast DNA Spin Kit (for soil) de BIO 101, Inc. El ADN extraído con el anterior método presentaba una pureza muy baja y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) falló en amplificar los genes de interés. Debido a lo anterior, se realizó otra extracción de ADN utilizando este kit. El kit se basa en la lisis mecánica de la célula por medio de un homogenizador de alta velocidad. Debido a que no se contaba con este equipo se agitaron las muestras con un vortex convencional durante 30 minutos.

- 1) Equipo y material:
 - a) Columna de purificación (proveído por el kit).

- b) Tubos plásticos estériles de 1.5 mL.
 - c) Tubos de recolección (proveído por el kit).
 - d) Vortex.
 - e) Centrifuga (12,000 g).
 - f) Micropipetas y puntas (volumen requerido 100-1000 μ L).
- 2) Reactivos a utilizar:
- a) Solución de Adhesión a Matriz (proveído por el kit).
 - b) Solución SEWS-M (proveído por el kit).
 - c) Agua libre de pirógenos y ADNasas (proveído por el kit).
 - d) Buffer de fosfatos de sodio (proveído por el kit).
 - e) Buffer MT (proveído por el kit).
 - f) Agua destilada estéril.
- 3) Procedimiento:
- a) Se tomó 1 mL de cada caldo nutritivo con cepas presuntivas seleccionadas de *Bacillus thuringiensis* luego de la incubación durante 24 horas a 36°C.
 - b) Se centrifugó el caldo a 5000 g durante 5 minutos.
 - c) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con 100 μ L de agua destilada estéril.
 - d) Se transfirieron los 100 μ L a un Tubo con Tejido Matriz.
 - e) Se agregaron 978 μ L de buffer de fosfatos de sodio y 122 μ L de buffer MT.
 - f) Se aseguraron los tubos en un vortex y se agitó a velocidad moderada-rápida durante 30 minutos.
 - g) Se centrifugaron los tubos a 12,000 g durante 30 segundos.
 - h) El sobrenadante se transfirió a un tubo plástico de 1.5 mL estéril.
 - i) Se agregaron 250 μ L del reactivo PPS y se invirtieron los tubos a mano 10 veces.
 - j) Se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo plástico de 1.5 mL estéril.
 - k) Se agregó 1 mL de la Suspensión de Adhesión a Membrana previamente agitada.

- l) Se invirtieron los tubos a mano durante 2 minutos para que el ADN se adhiriera a la membrana.
- m) Se removieron 500 μ L del sobrenadante y se descartaron.
- n) La Solución de Adhesión a Membrana se resuspendió en el líquido restante y se transfirió a la columna de purificación.
- o) Se centrifugó a 12,000 g durante 1 minuto. Se descartó el líquido en el tubo de recolección y se reinsertó la columna.
- p) Se agregó 500 μ L de SEWS-M a la columna y se centrifugó a 12,000 g durante 1 minuto.
- q) Se descartó el líquido en el tubo recolector y se reinsertó la columna.
- r) Se centrifugó a 12,000 g durante 2 minutos para que se secase la columna.
- s) La columna fue transferida a otro tubo de recolección y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se secase la matriz.
- t) Se agregaron 50 μ L de agua libre de pirógenos y ADNasas a la columna y se centrifugó a 12,000 g durante 1 minuto.
- u) El líquido recolectado contenía el ADN y fue almacenado a -20°C ,

4. Extracción de ADN de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* utilizando Chelex-100.

a. Debido a que el ADN extraído con ambos kits no era de una calidad aceptable se procedió a extraer nuevamente ADN con la resina Chelex-100. Este método de extracción es una modificación por Roche (2008) de la extracción de ADN utilizada para *Plasmodium sp.* en el laboratorio de malaria en el Centro de Estudios en Salud en el Instituto de Investigaciones en la Universidad del Valle de Guatemala. Se basa en las propiedades quelantes de la membrana que desactivan las nucleasas y, por consiguiente, se protege el ADN.

- 1) Equipo y material:
 - a) Centrifuga (12,000 g).
 - b) Vortex.
 - c) Tubos de 1.5 mL.
 - d) Estufa.

- 2) Reactivos a utilizar:

- a) Solución al 5% de Chelex 100 en agua destilada estéril.
 - b) Agua destilada estéril.
 - c) Tris-HCl pH 8.0 10 mM
- 3) Procedimiento:
- a) Un asada de una colonia fue resuspendida en 25 μ L de agua destilada estéril en un tubo de 1.50 mL.
 - b) Se agregó 100 μ L de una solución 5% Chelex 100.
 - c) Las muestras fueron colocadas en agua hirviendo durante 5 minutos.
 - d) Después de la incubación, las muestras fueron agitadas con vortex 30 segundos.
 - e) Las muestras fueron colocadas una vez más en agua hirviendo durante 5 minutos.
 - f) Se centrifugaron las muestras a 12,000 g durante 2 minutos.
 - g) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en una solución acuosa de Tris-HCl pH 8.0 10 mM.
 - h) Se almacenaron las muestras a -20°C .

5. Cuantificación de ADN extraído de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* utilizando los tres métodos anteriormente descritos.

a. Para comprobar que la extracción resultara en ADN de concentración y pureza aceptable se cuantificó por medio de un espectrofotómetro determinando la densidad óptica de la solución a 260 y 280 nm. También como método de control de calidad del ADN extraído se realizó un PCR para ver si el ADN extraído era de calidad suficiente para amplificar los genes de interés.

- 1) Equipo y material:
 - a) Cubeta de cuarzo.
 - b) Micropipeta y puntas (volumen requerido 5 – 495 μ L)
 - c) Espectrofotómetro UV (Unico UV-2100)
- 2) Reactivos a utilizar:
 - a) Agua destilada.

3) Procedimiento:

- a) 15 minutos previos a realizar las lecturas se encendió la lámpara UV del espectrofotómetro.
- b) Se realizó una dilución 1:50 de las muestras de ADN de *B. thuringiensis* extraídas con los 3 métodos y agua destilada respectivamente (500 µL en total).
- c) Se midieron las absorbancias de las distintas diluciones a 260 y 280 nm utilizando un blanco en cada caso. El blanco era únicamente agua.
- d) Se calculó la concentración de ADN de la siguiente manera:

$$\left[\right] \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = A_{260} \times \text{Dilución} \times 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

(Ecuación 1)

- e) Se calculó la pureza del ADN de la siguiente manera:

$$\text{Pureza} = A_{260} / A_{280}$$

(Ecuación 2)

B. Amplificación por PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* seleccionadas, ligación al vector de clonación y electroporación a células *E. coli*.

1. Amplificación por PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R de cepas presuntivas seleccionadas de *B. thuringiensis*.

a. Para la amplificación se utilizaron los cebadores propuestos por Berón (2005). Estos cebadores universales amplifican genes *cry* de familias conocidas y desconocidas lo que facilita el descubrimiento de nuevos genes *cry* aun no descritos en la literatura.

1) Equipo y material:

- a) Tubos plásticos estériles de 0.2 mL.
- b) Termociclador Apollo ATC 401.
- c) Micropipetas y puntas (volumen requerido 1-1000 µL).

2) Reactivos a utilizar:

- Reactivos de PCR (Buffer, MgCl₂, dNTP's, Taq Pol).

- Primers OL1F (5'-

TAHCANYATAYGCACARGCHGCMAAYTTHCAT-3') y OL5R (5'-GGAATAAATTCRATTYTRTCTATATAAAA-3').

3) Procedimiento:

a) Se esterilizó la campana de flujo laminar y de PCR con etanol al 70% y luz UV durante 15 minutos.

b) En la campana de PCR, se preparó la mezcla matriz o master mix de la siguiente manera:

c)

Cuadro 1. Orden y reactivos de PCR con cebadores OL1F/OL5R

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
ddH ₂ O	-	-	2.8 µL
Buffer	10X	1X	1.0 µL
MgCl ₂	50.0 mM	5.0 mM	1.0 µL
dNTP's	10.0 mM	0.4 mM	0.4 µL
Primer Mix	20 pmol/µL	1.2 pmol/µL	0.6 µL
Taq Pol	5 u/µL	0.1 u/µL	0.2 µL
Volumen total	-	-	6.0 µL

d) El master mix fue distribuido a los tubos de 0.2 mL.

e) En la campana de flujo laminar, se depositó 4 µL de cada muestra de ADN a los tubos con master mix apropiados.

f) Se depositó 4 µL de ADN de Dipel® (*B. thuringiensis* var. kurstaki) como control positivo y 4 µL de agua destilada estéril como control negativo en los tubos apropiados.

g) Los tubos fueron colocados en el termociclador Apollo y se utilizó el siguiente programa:

Cuadro 2. Programa para PCR para amplificación con cebadores OL1F/OL5R

Temperatura (°C)	Función	Tiempo	Ciclos
94	Desnaturalización inicial	2 minutos	} 35 ciclos
94	Desnaturalización	45 segundos	
46	Annealing	1 minutos	
72	Elongación	1 minuto	
72	Elongación final	3 minutos	

h) Los productos del PCR fueron separados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% a 100V durante 30 minutos como descrito a continuación.

i) Se estimó el peso de los productos comparándolos con un marcador molecular de pesos conocidos.

2. Visualización de ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa.

a. Las distintas moléculas de ADN obtenidas durante el transcurso del experimento (productos de PCR y plásmidos) fueron visualizados mediante una separación en base a tamaño en un gel de agarosa del porcentaje apropiado.

1) Equipo:

- a) Micropipetas y puntas (volumen requerido 1-15 μ L).
- b) Cámaras de electroforesis con regulador de voltaje.
- c) Microondas.
- d) Balanza analítica.

2) Reactivos a utilizar:

- a) Agarosa.
- b) Buffer TBE.
- c) Loading dye.
- d) Bromuro de etidio.

3) Procedimiento:

a) Se armó la cámara de electroforesis colocando los peines necesarios para la cantidad de muestras a cargar.

b) Se pesó la cantidad adecuada de agarosa dependiendo del porcentaje de concentración del gel y el volumen de solución a colocar en la cámara de electroforesis.

c) La agarosa pesada se disolvió en el volumen adecuado de buffer TBE 1X para obtener una solución de agarosa del porcentaje deseado.

d) La solución se colocó en un microondas y se calentó hasta que la agarosa se disolviera por completo.

e) Se esperó a que el líquido se enfriará aproximadamente a unos 50°C y se agregó la cantidad adecuada de bromuro de etidio.

- f) Se depositó la solución de agarosa con bromuro de etidio en la cámara de electroforesis y se esperó a que polimerizara.
- g) Se inundó la cámara con buffer TBE 1X.
- h) 5 μ L de cada muestra a cargar se mezclaron con 1 μ L de loading dye (en el caso de los plásmidos se cargaba menos volumen, desde 1 μ L hasta 15 μ L, dependiendo de la concentración esperada).
- i) Se colocaron la cantidad adecuada de cada muestra con loading dye en el pozo respectivo.
- j) Cada gel incluye un marcador molecular con bandas de peso conocido, un control positivo y un control negativo.
- k) Se corre el gel con un voltaje y tiempo adecuado.
- l) Luego de la electroforesis el gel es visto bajo una luz UV y se registran los resultados por medio de una fotografía.

3. Purificación de productos de la amplificación por PCR.

a. Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation). Se utiliza este kit para purificar los productos de la amplificación por PCR para posteriormente ligarlos al vector p-GEMT y llevar a cabo la transformación de bacterias.

- 1) Equipo:
 - a) Centrifuga (15,000 x g).
 - b) Micropipetas y puntas (volumen requerido 50-700 μ L).
 - c) Tubos 1.5 mL.
 - d) Minicolumnas SV.
 - e) Tubos recolectores.
- 2) Reactivos a utilizar:
 - a) Agua libre de nucleasas.
 - b) Solución lavadora de membrana (Acetato de potasio pH 5.0 10 mM, Etanol 80%, EDTA pH 8.0 16.7 μ M).
 - c) Solución adherente a membrana (Isotiocianato de guanidina 4.5 M, Acetato de potasio pH 5.0 0.5 M).

- 3) Procedimiento:
 - a) A 50 μ L del producto de PCR de la amplificación de genes *cry* se le agregó una cantidad igual de la solución adherente a membrana.
 - b) Se insertó una minicolumna SV a un tubo recolector.
 - c) Se transfirió la mezcla a la columna con una micropipeta. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minutos.
 - d) Se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto. Se descartó el liquido en el tubo recolector y se re insertó la minicolumna SV.
 - e) Se agregaron 700 μ L de la solución lavadora de membrana y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto. Se descartó el liquido en el tubo recolector y se re insertó la minicolumna SV.
 - f) Se repitió el paso e con 500 μ L de la solución lavadora de membrana y se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos.
 - g) Se descartó el liquido en el tubo recolector, se re insertó la minicolumna SV y se centrifugó 1 minutos a velocidad máxima sin tapa.
 - h) Se transfirió la minicolumna a un tubo limpio y estéril de 1.5 mL.
 - i) Se colocaron 50 μ L de agua libre de nucleasas en la minicolumna y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto.
 - j) Se descartó la minicolumna y el ADN recolectado se almacenó a -20°C.

4. Ligación de productos purificados al vector p-GEMT:

- a. p-GEMT and p-GEMT Easy Vector System. (Promega Corporation). Se utiliza este kit para ligar los productos de PCR anteriormente purificados al vector de clonación p-GEMT Easy para una posterior transformación de bacterias competentes con el vector e inserto.

- 1) Equipo:
 - a) Micropipetas y puntas (volumen requerido 1-10 μ L).
 - b) Tubos 0.5 mL.
- 2) Reactivos a utilizar:
 - a) Buffer de ligación 2X (Tris-HCl pH 7.8 60 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, Polietilen glicol 10%)

- b) Vector p-GEMT Easy (50ng/ μ L)
- c) Producto de PCR
- d) ADN inserto control
- e) Ligasa de ADN T4 (3 unidades Weiss/ μ L)
- f) Agua desionizada

3) Procedimiento:

- a) Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% a 100 V durante 30 minutos de los productos amplificados por PCR como anteriormente descrito. Se utilizó bromuro de etidio para revelar el gel.
- b) Se comparó las bandas obtenidas de la amplificación con las bandas del marcador molecular de concentración conocida. Se estimó la concentración de cada banda.
- c) Se realizó un promedio de los pesos de las bandas y las concentraciones estimadas. Se asumió que la purificación del producto resultaba en la pérdida del 10% de la concentración.
- d) Se calculó la cantidad adecuada de inserto para cada proporción inserto:vector a utilizar (1:3, 1:1, 3:1) de la siguiente manera:

$$\frac{\text{ng del vector} \times \text{kb del inserto}}{\text{kb del vector}} \times \text{proporción inserto:vector} = \text{ng del inserto}$$

(Ecuación 3)

Por ejemplo, si se deseaba ligar insertos con un promedio de pesos de 500 pb a una proporción inserto: vector 1:3, se calculaba de la siguiente manera:

$$\frac{50 \text{ ng de vector} \times 0.5 \text{ kb inserto}}{3.0 \text{ kb vector}} \times \frac{1}{3} = 25 \text{ ng del inserto}$$

(Ecuación 4)

- e) Se prepararon las mezclas de ligación agregando 5 μ L del buffer de ligación, 1 μ L de del vector p-GEMT Easy, la cantidad adecuada del producto de PCR (ó 2 μ L del ADN control) y 1 μ L de la ligasa de ADN T4. Se aforó con agua desionizada a 10 μ L. La solución se mezcló con la micropipeta.
- f) Se colocaron los tubos a 4°C durante toda la noche.

g) Luego del periodo de incubación, se almacenaron las ligaciones a -20°C.

5. Transformación de células *E. coli* XL-1 Blue con el vector de clonación.

a. Las células son transformadas con el vector de clonación que contiene el inserto para luego determinar que bacterias transformadas contienen los insertos de interés.

1) Equipo:

- a) Electroporador Bio-Rad Gene Pulser II.
- b) Cubetas de electroporación de 0.1 cm Eppendorf.
- c) Pipetas plásticas estériles.
- d) Tubos estériles plásticos de 10 mL.
- e) Micropipetas y puntas (volumen requerido 1-200 μ L).
- f) Incubadora con agitación.
- g) Tubos plásticos de 1.5 mL.
- h) Centrifuga (5000 x g).
- i) Esparcidor de vidrio.
- j) Mechero de alcohol.

2) Reactivos a utilizar:

- a) Células *E. coli* XL-1 Blue electrocompetentes.
- b) Producto de ligación de insertos a vector p-GEMT Easy.
- c) Caldo y agar LB con tetraciclina (1.25 mg/mL) y ampicilina (100 mg/mL) alicuotado a 5 mL en tubos de vidrio estériles de 10 mL.
- d) Medio SOC (previamente calentado a 36°C) en alícuotas de 1 mL en tubos de 10 mL plásticos.

3) Procedimiento:

- a) Se colocaron los productos de ligación, las células electrocompetentes y las cubetas de electroporación a enfriar en hielo.
- b) Se encendió el electroporador y se configuró para electroporar con cubetas de 0.1 cm (1.8 kV de voltaje, 200 Ω de resistencia y 25 μ F de capacitancia).

- c) Se esperó a que las células electrocompetentes se descongelaran en el hielo.
- d) Se colocó 1 μ L del producto de ligación a electroporar en la cubeta de electroporación previamente enfriada. El producto de ligación fue regresado al hielo.
- e) Se agitaron con cuidado las células electrocompetentes y se colocaron 40 μ L de las células en la cubeta de electroporación. Las células electrocompetentes fueron regresadas al hielo.
- f) Se agitó con cuidado la mezcla dentro de la cubeta de electroporación.
- g) Se colocó la cubeta de electroporación en el electroporador y se hizo pasar carga presionando los dos botones rotulados como “Pulse” al mismo tiempo. Se esperó a que sonara un pitido y se dejó de presionar ambos botones.
- h) Inmediatamente el contenido de la cubeta fue transferido con una pipeta plástica estéril al tubo de 10 mL que contenía 1 mL de SOC previamente calentado a 36°C.
- i) Se repitieron los pasos d al h para cada muestra a electroporar.
- j) Los tubos con medio SOC inoculado fueron incubados 1 hora a 36°C con agitación (220 rpm).
- k) Después de 1 hora de incubación, el medio SOC inoculado fue transferido a tubos plásticos de 1.5 mL y se centrifugaron a 5000 g por 5 minutos.
- l) Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 200 μ L de caldo LB/ampicilina/tetraciclina.
- m) Se plaquearon 100 μ L del caldo LB inoculado en cajas Petri con agar LB/ampicilina/tetraciclina. Se realizó en duplicado.
- n) Las cajas fueron incubadas a 36°C durante 18 horas.

C. Selección y tamizaje de células *E. coli* transformadas con el vector de clonación.

1. Selección de células *E. coli* transformadas.

a. Las siembras de las células transformadas *E. coli* se hacen en duplicado, en medio con y sin X-gal e IPTG debido a que el inserto al ser expresado es tóxico para la bacteria, impidiendo su crecimiento normal.

1) Equipo y material:

- a) Cajas Petri con medio LB/ampicilina/tetraciclina
- b) Cuadrilla para cajas Petri de 36 cuadros
- c) Incubadora
- d) Palillos de dientes.

2) Reactivos a utilizar:

- a) Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) (0.2 g en 1 mL de agua destilada, esterilizado por filtración).
- b) 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopiranosido (X-gal) (20 mg en 1 mL de dimetilformamida).

3) Procedimiento:

- a) Antes de inocular las bacterias transformadas, a la mitad de las cajas Petri a utilizar se les colocó y distribuyó por toda la superficie del medio 4 μ L de IPTG (0.2 g/mL) y 40 μ L de X-gal (0.02 g/mL).
- b) Las cajas Petri fueron incubadas a 36°C durante 1 hora.
- c) Las colonias obtenidas de la electroporación fueron seleccionadas y plaqueadas en el medio LB utilizando el esquema de la cuadrilla. La reinoculación se realizó en duplicado, una en medio LB/ampicilina/tetraciclina y otra en el mismo medio pero con X-Gal e IPTG.
- d) Las cajas fueron incubadas a 36°C durante 16 horas.
- e) Al finalizar el período de incubación se evaluó el crecimiento de las bacterias en ambos medios.

2. Tamizaje de clones por medio de PCR utilizando cebadores pUC/M13.

a. Se utilizó un método de inoculación directa de la colonia en el master mix del PCR para la detección del tamaño del inserto utilizando las secuencias pUC/M13 incluidas en el vector ya que se encuentran en los extremos de donde se insertaron los genes.

1) Equipo y material:

- a) Tubos plásticos estériles de 0.2 mL
- b) Termociclador Apollo ATC 401.
- c) Micropipetas y puntas (volumen requerido 1-1000 μ L)

- 2) Reactivos a utilizar:
- Reactivos de PCR (Buffer, MgCl₂, dNTP's, Taq Pol)
 - Primers M13F-pUC (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') y M13R-pUC (5'-CAGGAAACAGCTATGA-3')

- 3) Procedimiento:
- Se esterilizó la campana de flujo laminar y de PCR con etanol al 70% y luz UV durante 15 minutos.
 - En la campana de PCR, se preparó la mezcla matriz o master mix de la siguiente manera:

Cuadro 3. Orden y reactivos de PCR para el tamizaje de células transformadas utilizando cebadores pUC/M13.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
ddH ₂ O	-	-	12.4 µL
Buffer	5X	1X	4.0 µL
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.2 µL
dNTP's	10.0 mM	0.2 mM	0.4 µL
Primers	10 pmol/µL	0.4 pmol/µL	0.8 µL
Taq Pol	5 u/µL	0.1 u/µL	0.4 µL
Volumen total	-	-	20.0 µL

- El master mix fue distribuido a los tubos de 0.2 mL.
- En la campana de flujo laminar, se seleccionó las colonias a ser tamizadas. Se eligieron las colonias que no presentaban un color azul en el medio con IPTG y X-Gal.
- Con la punta plástica de una micropipeta, la colonia a ser tamizada se inoculó en el master mix.
- Los tubos fueron colocados en el termociclador Apollo y se utilizó el siguiente programa:

Cuadro 4. Programa para PCR de tamizaje con cebadores M13/pUC

Temperatura (°C)	Función	Tiempo	Ciclos
95	Desnaturalización inicial	2 minutos	} 30 ciclos
95	Desnaturalización	1 minuto	
52	Annealing	1 minutos	
72	Elongación	1 minuto	
72	Elongación final	5 minutos	

g) Los productos del PCR fueron separados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% a 100V durante 30 minutos como descrito anteriormente.

h) Se estimó el peso de los productos comparándolos con un marcador molecular de pesos conocidos y se determinó que bacterias presentaban insertos de interés.

3. Screening de clones por medio de extracción de plásmidos.

a. Con el método descrito a continuación de Davis (1998) se extraen los plásmidos de las bacterias transformadas y por medio de una electroforesis en gel de agarosa se puede deducir que plásmidos contienen insertos.

1) Equipo y material:

- a) Micropipetas y puntas (volumen requerido 10-1000 μ L)
- b) Centrifuga (3250 rpm)
- c) Tubos de 0.6 mL.

2) Reactivos a utilizar:

a) Buffer de lisis (10 μ L de ARNasa A, 0.4 g de sacarosa, 200 μ L de EDTA 0.5 M pH 8, 100 μ L SDS 10% y 0.0025 g de azul de bromofenol aforado a 1 mL con H₂O estéril).

- b) Cloroformo.
- c) Fenol.
- d) Caldo LB.

3) Procedimiento:

a) Se seleccionaron las colonias a tamizar. Se eligieron las colonias que no presentaban un color azul en el medio con X-gal e IPTG.

b) Una asada de la colonia se resuspendió en 30 μ L de caldo LB previamente colocado en los tubos de 0.6 mL.

c) 30 μ L de una solución buffer de lisis: cloroformo: fenol (1:1:1) se agregó al caldo LB con la bacteria resuspendida.

d) Se agitó la solución 3 veces con la micropipeta.

e) Los pasos b-d se repitieron para cada colonia a ser tamizada.

f) Los tubos fueron centrifugados a 3250 rpm durante 10 minutos.

- g) 15 μL de la solución fueron colocados en diferentes pozos de un gel de agarosa al 0.7%.
- h) Se realizó una separación de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 100 V durante 40 minutos como descrito anteriormente.
- i) Se comparó los distintos pesos de los plásmidos y se evaluó que bacterias contenían insertos de interés.

D. Aislamiento de plásmidos con insertos de interés.

1. Cultivo de bacterias con inserto de interés y extracción de plásmidos:

a. Wizard Plus – SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation). Se utiliza este kit para extraer los plásmidos de las bacterias que contenían inserto de interés para una posterior secuenciación.

1) Equipo:

- a) Micropipetas y puntas (volumen requerido 10-1000 μL).
- b) Centrifuga (5000 rpm).
- c) Tubos plásticos estériles de 1.5 mL.
- d) Tubos de colección (Kit).
- e) Columna de purificación (Kit).
- f) Tubos de vidrio estériles de 10 mL.

2) Reactivos a utilizar:

- a) Medio LB con tetraciclina (1.25 mg/mL) y ampicilina (100 mg/mL) alicuotado a 5 mL en tubos de vidrio estériles de 10 mL.
- b) Solución de Resuspensión de Células (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, EDTA 10 mM, RNasa A 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- c) Solución de Lisis de Células (NaOH 0.2 M, SDS 1%).
- d) Solución de Neutralización (Hidrocloreuro de guanidina 4.09 M, Acetato de potasio 0.759 M, Ácido acético glacial 2.12 M).
- e) Solución de Lavado (Acetato de potasio 60 mM, Tris-HCl pH 7.5 8.3 mM, EDTA pH 8.0 0.04 mM).
- f) Etanol 60%.

g) Agua libre de nucleasas.

3) Procedimiento:

- a) Las bacterias que contenían insertos de interés fueron inoculadas en 5 mL de caldo LB con tetraciclina (1.25 mg/mL) y ampicilina (100 mg/mL).
- b) Los medio fueron incubados a 36°C durante 18 horas con agitación.
- c) Luego de la incubación, 4 mL del medio fueron centrifugados a 5000 rpm durante 5 minutos.
- d) Se descartó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 250 µL de la Solución de Resuspensión de Células.
- e) Se le agregó 250 µL de la Solución de Lisis de Células a cada muestra. Se invirtió 4 veces cada tubo.
- f) Se agregó 10 µL de Solución de Proteasa Alcalina. Se invirtió cada tubo 4 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- g) Se agrego 350 µL de la Solución Neutralizante. Se invirtió cada tubo 4 veces.
- h) Se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos.
- i) Se insertó una columna en un tubo de recolección por cada muestra a extraer.
- j) Se decantó el liquido hacia la columna, teniendo cuidado de no decantar el sólido en el fondo del tubo.
- k) Se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto. Se descartó el líquido en el tubo de colección y se reinsertó la columna.
- l) Se agregó 750 µL de la Solución de Lavado a cada tubo. Se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto.
- m) Se descartó el líquido en el tubo de colección y se reinsertó la columna.
- n) Se agregó 250 µL de la Solución de Lavado a cada tubo y se centrifugó a velocidad máxima durante 2 minutos.
- o) Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 mL estéril.
- p) Se agregó 100 µL de agua libre de nucleasas a la columna. Se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto.
- q) La concentración de plásmido fue determinado como descrito anteriormente con una dilución de 1:250 diluido en agua destilada estéril.

r) Se realizaron las diluciones necesarias para obtener 100 μL de plásmido a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, lo cual fue enviado a secuenciar. El resto fue almacenado a -20°C .

E. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para analizar el patrón de proteínas de las distintas cepas presuntivas de *B. thuringiensis*.

1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio de extracto celular de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* seleccionadas.

a. Para determinar si las distintas cepas presuntivas de *B. thuringiensis* expresan las proteínas que fueron deducidas del análisis de ADN se realizó un separación de un extracto celular de las cepas por medio de SDS-PAGE. Se estandarizó la cantidad de muestra montada en el gel.

1) Equipo:

- a) Kit para electroforesis vertical Bio-Rad Miniprotean® 3 Cell.
- b) Espectrofotómetro (Unico UV-2100)
- c) Centrifuga (5,000 g).
- d) Estufa.
- e) Micropipetas y puntas (volumen requerido 2 – 1000 μL).

2) Reactivos a utilizar:

- a) Caldo nutritivo.
- b) Agua destilada estéril.
- c) Solución 30% acrilamida/0.8% bisacrilamida.
- d) 4X Tris-Cl/SDS pH 8.8.
- e) 4X Tris-Cl/SDS, pH 6.8.
- f) Persulfato de amonio 10%.
- g) TEMED.
- h) Buffer de muestra 2X (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol).

3) Procedimiento:

- a) Las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* que se deseaban analizar se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron 48 horas a 36°C con agitación.
- b) Al finalizar el periodo de incubación se centrifugaron las células a 5,000 g durante 5 minutos.
- c) Se descartó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en agua destilada estéril.
- d) Se centrifugó una vez más a 5,000 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril.
- e) Se tomó una alícuota de 5 µL de cada solución de células y se diluyó con 495 µL de agua destilada estéril.
- f) Se determinó la densidad óptica por medio de un espectrofotómetro (Unico UV-2100) a 405 nm.
- g) Una vez determinada la densidad óptica de todas las soluciones con células se estandarizaron diluyendo todas las cepas a la densidad óptica más baja.
- h) Se lavaron los vidrios a utilizarse con agua, agua y jabón, etanol y se secaron perfectamente.
- i) Se colocaron los vidrios limpios a utilizarse en el soporte proveído por el kit en forma de sándwich como indicado por el fabricante.
- j) Se preparó el gel separador en un vaso de precipitado agregando 5.00 mL de 30% acrilamida/0.8 bisacrilamida, 3.75 mL 4X Tris-Cl/SDS pH 8.8 y 6.25 mL de agua destilada estéril.
- k) Se agregó 50 µL de persulfato de amonio al 10% y 10 µL de TEMED a la mezcla anterior. Se agitó suavemente la mezcla.
- l) Inmediatamente se transfirió la solución al sándwich de vidrios en el soporte hasta dejar aproximadamente 1 cm libre en el extremo superior.
- m) Utilizando una micropipeta de 1000 µL se aplicó suavemente 1 mL de agua sobre la mezcla.
- n) Se esperó aproximadamente 20 minutos a que el gel polimerizara.
- o) Se removió el agua sobre el gel volteando el soporte sobre una servilleta.
- p) En otro vaso de precipitar, se preparó el gel concentrador agregando 0.65 mL de 30% acrilamida /0.8% bisacrilamida, 1.25 mL de 4X Tris-Cl/SDS pH 6.8 y 3.05 mL de agua destilada estéril.

- q) Se agregó 25 μL de persulfato de amonio al 10% y 5 μL de TEMED. Se agitó suavemente.
- r) Inmediatamente se agregó la solución sobre el gel separador y se colocó el peine con la cantidad de pozos deseados.
- s) Se esperó aproximadamente 20 minutos a que el gel polimerizara.
- t) Las diluciones preparadas de bacteria se diluyeron 1:1 con buffer de muestra 2X y la solución se calentó durante 5 minutos a 100°C en baño maría.
- u) Con cuidado, se removió el peine y los vidrios con el gel se colocaron dentro de la cámara de electroforesis. Se inundó la cámara con buffer SDS de electroforesis 1X.
- v) Se cargó 5 μL de cada solución de células y 2 μL del marcador molecular (Bio-Rad All Blue) en los respectivos.
- w) Se conectó la cámara a una fuente de poder y se aplicaron 100V durante 1 hora 30 minutos.
- x) Al terminar el tiempo de corrida los geles fueron removidos cuidadosamente de los vidrios y teñidos como descrito a continuación.

2. Tinción de plata para gel obtenido por SDS-PAGE.

a. Los geles obtenidos por SDS-PAGE se tiñeron con dos distintos métodos. El primero fue una tinción de plata debido a que presenta una gran sensibilidad para teñir las proteínas presentes en el gel.

- 1) Equipo:
 - a) Agitador

- 2) Reactivos a utilizar:
 - a) Solución etanol: ácido acético: agua (30:60:10).
 - b) Etanol 30%.
 - c) Solución de tiosulfato de sodio (0.01 g de tiosulfato de sodio y 50 mL de agua destilada estéril).
 - d) Solución de nitrato de plata 0.1% (0.1 gramos de nitrato de plata, 50 mL de agua destilada estéril y 25 μL de formaldehído).

e) Buffer de revelado (3 g Na₂CO₃, 1 mL de solución de tiosulfato de sodio, 25 µL de formaldehído aforado a 50 mL).

f) Cloruro de sodio 3 M.

g) Ácido acético 2.3 M.

3) Procedimiento:

a) El gel obtenido del SDS-PAGE fue colocado en una solución etanol: ácido acético: agua (30:10:60) durante 12 horas.

b) Se lavó 30 minutos con etanol 30% con agitación suave.

c) Se lavó en agua destilada estéril y se repitió el paso b.

d) Luego, se lavó con agua destilada estéril durante 10 minutos.

e) El gel se colocó en la solución de tiosulfato de sodio durante 1 minuto.

f) Se lavó el gel con agua destilada estéril dos veces más.

g) El gel se colocó 10 minutos en una solución de nitrato de plata al 0.1%. La solución anterior fue descartada con una solución 3 M de NaCl.

h) Se lavó el gel en buffer de revelado durante 1 minuto.

i) Se agregó 5 mL de ácido acético 2.3 M y se agitó durante 10 minutos.

j) Los resultados fueron registrados con una fotografía.

3. Tinción de azul de Coomassie para gel obtenido por medio de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida / Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE).

a. Se realizó una tinción de azul de Coomassie a otro gel obtenido por medio de SDS-PAGE debido a que la tinción de plata no fue la adecuada para observar el patrón de proteínas de las distintas cepas de *B. thuringiensis*.

1) Equipo y materiales

a. Agitador.

2) Reactivos

a. Coomassie Brilliant Blue (G-250).

b. Solución metanol: agua: ácido acético (40:50:10).

- c. Agua destilada estéril.

- 3) Procedimiento

- a. Se colocó el gel obtenido por SDS-PAGE en la solución de azul de Coomassie 0.1% en metanol: agua: ácido acético (40:50:10) y se colocó en un agitador durante 20 minutos.
- b. Se removió el gel de la solución de tinción y se lavó con agua destilada estéril.
- c. Se colocó el gel en la solución metanol: agua: ácido acético (40:50:10) durante 24 horas a 4°C.
- d. El gel se removió de la solución y se registraron las bandas por medio de una fotografía.

- F. Análisis del patrón de plásmidos de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas.

1. Análisis del patrón de plásmido de cepas presuntivas de *B. thuringiensis*.

- a. Con el objetivo de evaluar la diversidad de las cepas presuntivas seleccionadas de *B. thuringiensis* se extrajo los plásmidos de las bacterias y se intentaron separar en un gel de agarosa. El protocolo fue obtenido de Porcar *et al* (1999).

- 1) Equipo:

- a) Micropipetas y puntas (volumen requerido 10-1000 μ L).
- b) Centrifuga (5,000 g).
- c) Incubadora.

- 2) Reactivos a utilizar:

- a) Caldo LB.
- b) Buffer TE (Tris-HCl 40 mmol, EDTA 2 mmol, pH 7.9)
- c) Buffer de lisis (SDS 3% p/v, sacarosa 15% p/v, Tris-base 50 mmol, pH 12.5).
- d) Solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)
- e) Proteinasa K.

- 3) Procedimiento:
 - a) Las distintas cepas presuntivas de *B. thuringiensis* fueron inoculadas en caldo LB y se incubaron con agitación durante 24 horas.
 - b) Luego de la incubación, 2 mL del caldo inoculado se centrifugó a 5,000 g durante 5 minutos.
 - c) Se descartó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 100 μ L de buffer TE.
 - d) Se agregó 200 μ L de buffer de lisis. La mezcla fue incubada a 60°C durante 30 minutos
 - e) Se agregaron 5 unidades de proteinasa K y los tubos fueron incubados a 41°C durante 90 minutos.
 - f) Se agregó a cada muestra 1 mL de una solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Los tubos fueron cuidadosamente invertidos varias veces.
 - g) Las muestras fueron centrifugadas a 9000 g durante 7 minutos.
 - h) Los plásmidos se separaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 5% a 10V durante 24 horas a 4°C como descrito anteriormente. El gel fue teñido con bromuro de etidio concentrado durante 2 horas y los resultados fueron registrados con una fotografía bajo luz UV.

G. Análisis computacional de secuencias obtenidas clonadas a partir de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* seleccionadas.

a. Las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados por PCR fueron analizadas para determinar la relación evolutiva de las cepas seleccionadas con respecto a otras especies del género *Bacillus* y de *B. thuringiensis*.

- 1) Obtención de secuencias consenso (contigs):
 - a) Se obtuvo dos secuencias de cada uno de los 15 fragmentos clonados. Las secuencias fueron obtenidas utilizando los cebadores pUC/M13. Una secuencia correspondía a la obtenida con el cebador Forward y otra con el cebador Reverse.
 - b) Las secuencias consenso (contig) de cada fragmento clonado fueron determinadas utilizando el programa SeqMan Pro de DNASTAR Lasergene.
 - c) En la ventana “Unassembled Sequences” se presionó el botón “Add Sequences” y se agregaron las 30 secuencias obtenidas.

d) Luego se presionó el botón “Assemble in Groups” y se seleccionó el identificador único de cada secuencia.

e) Se presionó el botón “Assemble” y se obtuvieron los contigs de cada fragmento amplificado.

f) En la ventana “untitled.sqd” se accedió a la información de cada secuencia y se eliminaron los extremos de las secuencias que presentaban lecturas del interferograma no definidas.

g) Las secuencias fueron almacenadas en un archivo tipo FASTA seleccionando la opción “Contig”, “Save consensus”, “Single File”.

2) BLAST:

a) Para realizar el BLAST de cada secuencia y su respectivo análisis filogenético se utilizó el programa MEGA 4.

b) En la ventana principal se seleccionó “Alignment” y luego “Alignment Explorer/CLUSTAL”.

c) En la ventana “M4: Alignment Editor” se seleccionó “Retrieve sequences from a file” y se seleccionó el archivo donde se almacenaron las secuencias consenso.

d) Se realizó una búsqueda de las secuencias cargadas para determinar si habían cebadores dentro de las secuencias. Si se encontraba el cebador OL1F se eliminaba la secuencia del cebador y toda las bases anteriores. Si se encontraba el cebador OL5R (invertido) se eliminaba el cebador y todas las bases posteriores.

e) Para cada una de las secuencias se hizo click derecho sobre el nombre y se selecciono la opción “BLAST Sequence”.

f) En la página del NCBI para BLAST se seleccionó la base de datos “nucleotide collection (nr/nt)” de la opción “Database” en la sección “Choose Search Set”.

g) Las primeras tres secuencias similares encontradas fueron almacenadas y se agrupó cada fragmento dependiendo del gen al que se le encontraba similitud.

h) Al finalizar el BLAST de cada fragmento se obtuvieron dos grupos de fragmentos: “ADN Polimerasa III” y “Alcohol Deshidrogenasa”.

3) Alineación y análisis evolutivo:

a) Para cada uno de los dos grupos se cargó al “M4: Alignment Editor” en MEGA 4 las secuencias de los fragmentos pertenecientes al grupo.

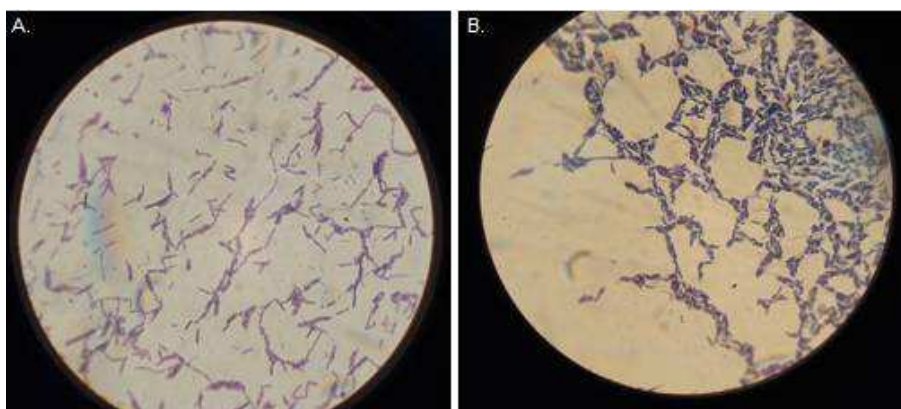
- b) Se agregó a las secuencias las secuencias almacenadas del BLAST, agregando una de cada especie del género *Bacillus* al que se encontró similitud y las dos cepas de *B. thuringiensis*.
- c) Se seleccionó del menú “Alignment” la opción “Alignment by ClustalW” y en la ventana emergente se presionó “OK”.
- d) Luego se presionó “Data” y “Exit AlnExplorer”. Se almacenó la sesión de alineamiento y de datos para realizar el análisis filogenético.
- e) En la ventana principal de MEGA 4 se seleccionó del menú “Phylogeny” “Bootstrap test of Phylogeny” y “Neighbor-Joining”.
- f) En la ventana emergente en la opción “Model” se seleccionó del menú “nucleotide” “p-distance”
- g) Se presionó “Compute” y se seleccionó la pestaña “Bootstrap consensus tree” de la ventana emergente.
- h) Se almacenaron los árboles filogenéticos obtenidos.

VII.RESULTADOS

A. Selección y cultivo de las distintas cepas presuntivas de *B. thuringiensis*:

La selección de cepas se hizo en base a una clasificación anterior de las cepas aisladas por medio de un análisis de la región 16S del ADN ribosomal (Roche, 2008). Todas las cepas presentaban patrones distintos de bandas para la amplificación de la región 16S. Las cepas se encontraban almacenadas en un medio de caldo nutritivo modificado en glicerol a -80°C . Las cepas y control positivo (Dipel ®) fueron inoculadas en caldo y agar nutritivo e incubadas a 37°C durante 24 horas. Todas las cepas y control positivo presentaron un crecimiento acelerado debido a que se observó colonias grandes distribuidas en la totalidad del medio al finalizar el periodo de incubación. Las colonias eran blancas y mucoides como descritas en el estudio mencionado con anterioridad. Se realizó una tinción Gram de frotos de todas las cepas y control positivo. En todos los casos se observaron bacilos Gram positivo como era de esperarse.

Figura 4. A. Gram de frote de cepa 1S22 de *B. thuringiensis* presuntivo. B. Gram de frote de cepa 10S21 de *B. thuringiensis* presuntivo. Ambos son bacilos Gram positivo como descritos en la literatura.



B. Extracción de ADN de cepas presuntivas de *B. thuringiensis*:

Se realizó la extracción de ADN de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* utilizando 2 distintos kits comerciales de extracción de ADN de suelos y un método modificado para la extracción de ADN de *Plasmodium sp.* utilizando la resina Chelex propuesto por Roche, 2008. La eficiencia de la extracción fue evaluada por medio de una determinación espectrofotométrica de la concentración y pureza del ADN y por una exitosa amplificación de ADN por medio de PCR.

Cuadro 5. Concentraciones y perezas de las muestras de ADN de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* extraído con dos kits comerciales y el método modificado de Chelex. Las concentraciones se encuentran en $\mu\text{g/mL}$.

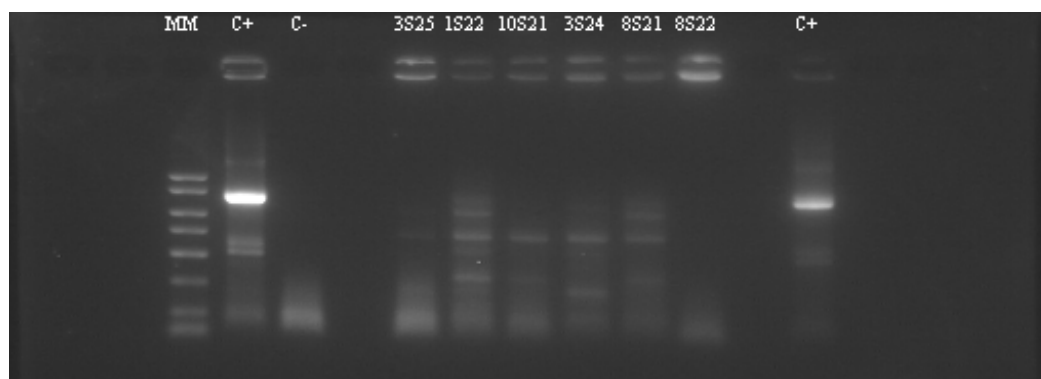
Muestra/Cepas	Ultra Clean Soil DNA		Fast DNA Spin Kit		Método Chelex®	
	Concentración	Pureza	Concentración	Pureza	Concentración	Pureza
Dipel	69.25	0.83	31.25	0.97	2075.0	1.07
1S22	82.60	0.76	51.86	0.85	2440.0	1.09
3S24	72.50	0.99	51.75	0.85	1640.0	1.08
3S25	75.00	1.07	39.60	0.83	2235.0	1.09
8S21	80.00	0.85	36.65	0.88	465.0	1.15
8S22	52.50	0.96	39.30	0.79	1630.0	1.09
10S21	59.80	0.92	43.00	0.89	560.0	1.08

Como se describe en el Cuadro 5, las concentraciones del ADN extraído con kits comerciales son bajas en comparación con el método Chelex. Aunque la pureza de la extracción por medio del método Chelex no es la ideal se logró obtener productos de la amplificación por PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R. Los otros dos métodos utilizados no resultaron en una amplificación de ADN por PCR. Por lo anterior, se decidió utilizar el ADN extraído con el método Chelex para llevar a cabo las clonaciones.

C. Amplificación por PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* y ligación al vector de clonación:

Se realizó una amplificación por PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R para su posterior ligación al vector de clonación. Como se observa en la Figura 4, cinco de las seis cepas seleccionadas amplificaron. En todos los casos se observa mas de una banda en el mismo carril.

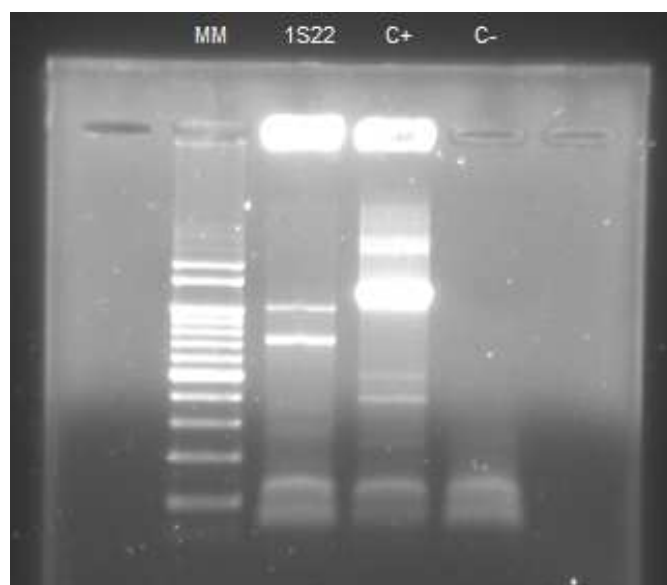
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R de las 6 cepas utilizadas. Pozo 1: Marcador Molecular; pozo 2 y 12: control positivo Dipel ®; pozo 3: control negativo (agua); pozo 5-10: productos de la amplificación correspondientes a las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* (3S25, 1S22, 10S21, 3S24, 8S21 Y 8S22).



La cepa 1S22 fue seleccionada para optimizar la proporción inserto: vector. Como se observa en la Figura 5, la cepa 1S22 presentaba 4 bandas de distintos tamaños (1000, 700, 500 y 300 pb).

Debido a que las bandas de 500 y 300 pb presentaban una amplificación leve, a comparación de las otras 2 bandas, se realizaron los cálculos respectivos para la ligación al vector de únicamente las bandas de 1000 y 700 pb. La ligación se realizó con 3 distintas proporciones inserto: vector (1:3, 1:1, 3:1).

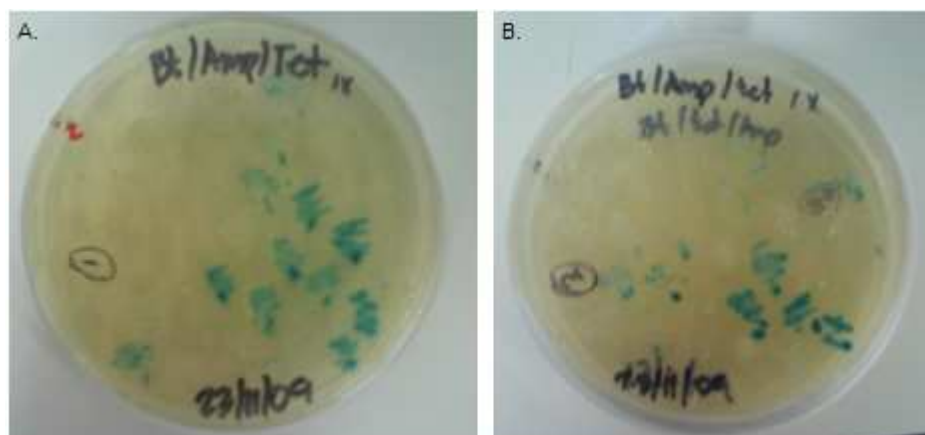
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR de la amplificación utilizando los cebadores OL1F/OL5R de la cepa 1S22 para ligación a vector de clonación pGEM-T Easy. Pozo 2: Marcador molecular; pozo 3: productos de amplificación correspondiente a la cepa presuntiva de *B. thuringiensis* 1S22; pozo 4: control positivo Dipel®; pozo 5: control negativo (agua).



D. Transformación:

Los fragmentos amplificados a partir de las cepas utilizando los cebadores OL1F/OL5R fueron ligados al vector de clonación en tres diferentes proporciones inserto:vector (1:3, 1:1, 3:1). Luego se realizó una electroporación y las células transformadas fueron plaqueadas en medio selectivo (por antibióticos). Para comprobar si el inserto era tóxico para la bacteria transformada al inducirse su expresión, se hicieron duplicas de cada transformado con y sin X-gal e IPTG. Las colonias presentes sobre el medio que contenía X-gal e IPTG crecían de una manera más lenta que las que no tenían X-gal e IPTG.

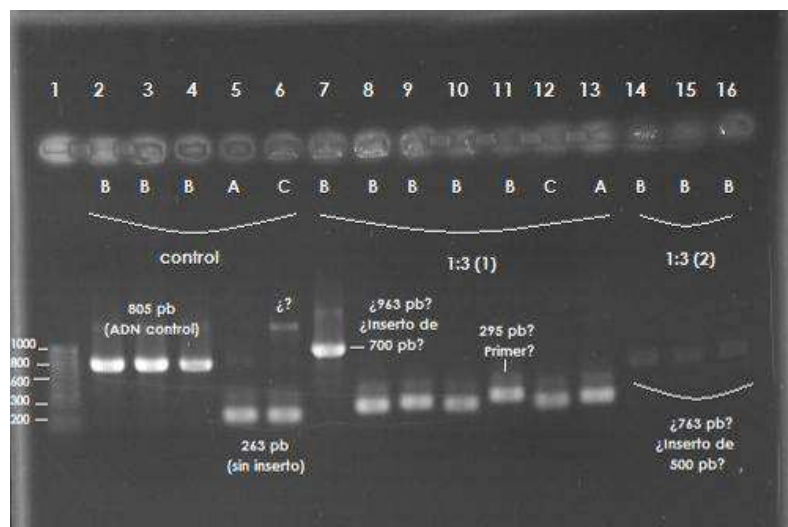
Figura 7. Bacterias *E. coli* transformadas plaqueadas en cuadrilla en presencia de IPTG y X-Gal.



E. Tamizaje de transformados:

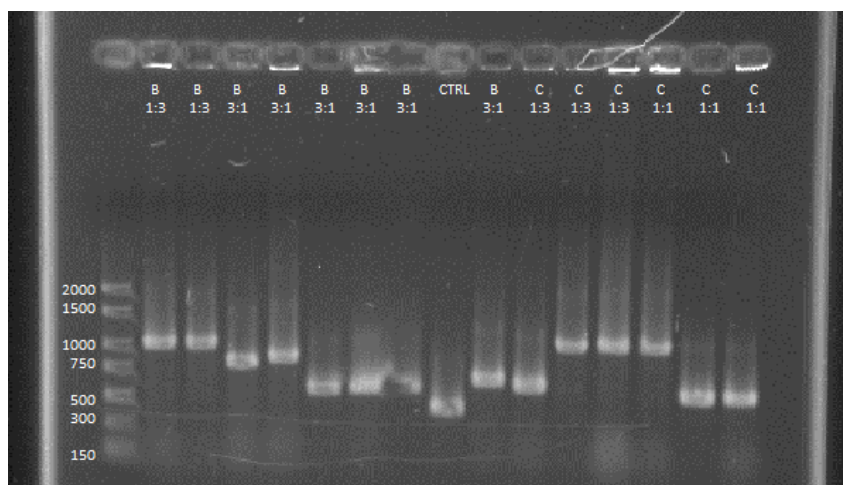
El tamizaje de las bacterias transformadas con los fragmentos amplificados de la cepa 1S22 fue hecho por un PCR utilizando cebadores M13/pUC. Se analizaron los fragmentos ligados utilizando las 3 distintas proporciones inserto:vector. Como se observa en la Figura 7 las tres distintas proporciones presentan insertos de distintos tamaños. Debido a lo anterior, se realizó la ligación de los fragmentos de las 4 cepas restantes utilizando las tres proporciones inserto:vector.

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR del tamizaje utilizando cebadores M13/pUC de 30 bacterias *E. coli* transformadas con insertos pertenecientes a la amplificación utilizando cebadores OL1F/OL5R de la cepa 1S22. Pozo 1: marcador molecular (Sigma®); pozos 2-16: productos de PCR M13/pUC con distintas proporciones inserto:vector. Las letras indican el origen de las bacterias.



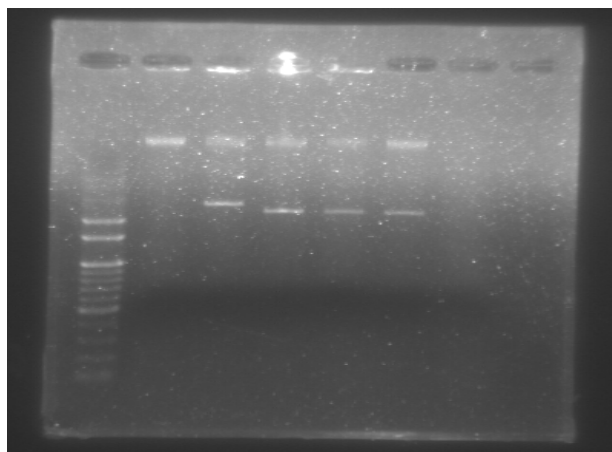
Como se observa en la Figura 7 se logró obtener fragmentos ligados en los vectores de distintos tamaños. Por ejemplo, en la Figura 8 en los pozos 3 y 4 se observan genes productos ligados de la cepa 10S21 de aproximadamente 750 y 300 pb respectivamente. En los pozos 11 y 12 se observan genes *cry* de la cepa 3S24 de aproximadamente 200 y 750 pb respectivamente.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR del tamizaje utilizando cebadores universales M13/pUC de bacterias *E. coli* transformadas con insertos de interés de la amplificación utilizando los cebadores OL1F/OL5R de cepas 10S21 y 3S24 con diferentes proporciones inserto:vector. Las letras identifican el origen de las bacterias. Pozo 1: Marcador molecular (150-2000 pb); pozos 2-7 y 9: fragmentos de la cepa 10S21 ligados al vector; pozo 8: control negativo (vector sin inserto); pozo 10-16: fragmentos de la cepa 3S24 ligados al vector.



El tamizaje también se realizó extrayendo los plásmidos de las bacterias transformadas. Como se observa en la Figura 9 los plásmidos de las bacterias transformadas son visibles, sin embargo no provee tanta información como el tamizaje por PCR utilizando los cebadores M13/pUC. Además es difícil estimar el tamaño de los insertos con este método.

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.6% de los plásmidos de las bacterias transformadas para determinar el tamaño de los insertos. Pozo 1: Marcador molecular (100-2000 pb); pozo 2: control negativo (bacteria sin plásmido); pozo 3 al 6: plásmidos de bacterias transformadas.



Por lo anterior, se realizaron los tamizajes de las cepas restantes por medio del PCR utilizando cebadores M13/pUC. Como se observa en la figura 9 se logró obtener fragmentos de distintos tamaños para las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* que amplificaron utilizando los cebadores OL1F/OL5R.

En el Cuadro 6 se observan los distintos fragmentos que se obtuvieron de las clonaciones. Son estos fragmentos los que fueron secuenciados. Se observa que se obtuvo al menos un fragmento clonado por cada una de las cinco cepas que amplificaron al realizar el PCR utilizando los cebadores OL1F/OL5R. También se observa que se ligaron distintos fragmentos al vector de clonación dependiendo de la proporción inserto:vector.

Cuadro 6. Productos de PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R ligados que fueron secuenciados. El cuadro incluye la cepa de la cual fue obtenido el producto de PCR y la proporción inserto: vector utilizado para ligar el fragmento al vector de clonación. Se observa que se obtuvo distintos fragmentos ligados dependiendo de la proporción inserto vector utilizada.

Cepa <i>B. thuringiensis</i>	Proporción (inserto: vector)	Tamaño estimados del producto (M13) (pb)	Tamaño estimado del inserto (pb)
10S21	1:3	1000	750
10S21	1:3	1000	750
10S21	3:1	750	300
10S21	3:1	500-750	300
3S24	1:3	500-750	200
3S24	1:3	1000	750
3S24	1:3	1000	750
3S24	1:1	500	200
1S22	1:3	500-750	500
1S22	1:3	500	300
1S22	3:1	500-750	500
8S21	1:3	1000-1500	1000
8S21	1:3	1000	750
8S21	1:3	500-750	300
8S22	1:1	1000-1250	900

F. Análisis de secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias en la base de datos del NCBI utilizando BLAST. No se detectó ninguna similitud de las secuencias con genes *cry*. Algunas secuencias obtenidas tienen una similitud alta con el gen de la ADN polimerasa III y alcohol

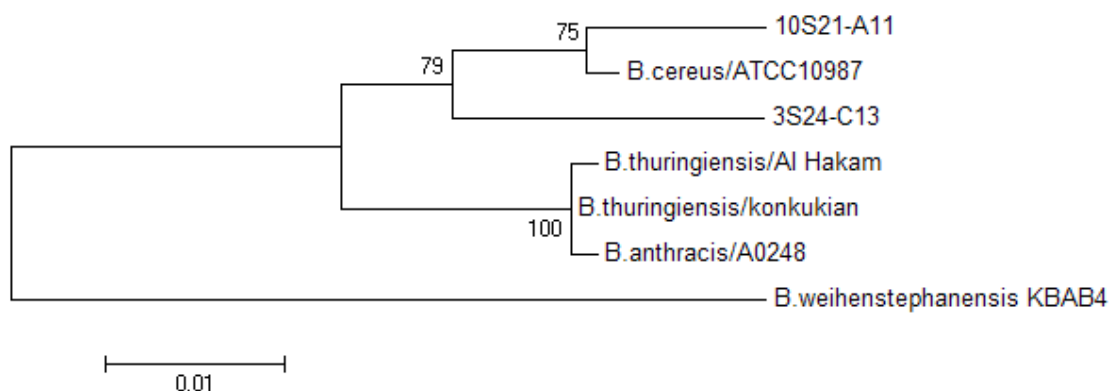
deshidrogenasa de varias especies del género *Bacillus*. Por lo anterior se concluye que no se amplificaron genes *cry* utilizando los cebadores OL1F/OL5R.

Todas las secuencias analizadas mostraban un E-value mucho menor al 0.05 del límite de confianza y un Max Identity mayor al 95% en la mayoría de los casos (ver anexos). Por esto se puede decir que la probabilidad de que los genes clonados no sean genes *cry* es mayor del 95% (E-value < 0.05).

Las secuencias fueron agrupadas con respecto al gen con el que mostraban mayor similitud y alineadas en conjunto con secuencias del gen de otras especies del género *Bacillus* y dos especies de *B. thuringiensis*.

Para el caso de los fragmentos que presentaban similitudes con el gen de la ADN polimerasa III (10S21-A11 y 3S24-C13) se les comparó con el mismo gen para las especies de *B. cereus* ATCC10987, *B. anthracis* A0248, *B. weihenstephanensis* KBAB4 (como out-group, debido a que era la secuencia que mostraba menor similitud a las analizadas) y dos especies de *B. thuringiensis* (Al Hakam y konkukian).

Figura 11. Relaciones filogenéticas entre 2 especies presuntivas de *B. thuringiensis* aisladas de la filosfera del árbol de aguacate con respecto a otras dos cepas de *B. thuringiensis* y cepas de *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. weihenstephanensis* utilizando el gen de la ADN polimerasa III. Se encontró que las secuencias obtenidas de las cepas seleccionadas que amplificaron para ese gen únicamente contenían relación con las especies de *Bacillus* anteriormente mencionadas. El árbol conciso fue construido utilizando el modelo de Neighbour Joining y Bootstrapping utilizando el programa computacional MEGA 4.



Se observa en la Figura 10 que las cepas 10S21 y 3S24 muestran una mayor relación con *B. cereus*, mientras que la relación de *B. thuringiensis* con *B. anthracis* no está resuelta. La cepa

de *B. wiehenstephanensis* es que muestra una mayor distancia de las cepas analizadas. Las cepas de *B. thuringiensis* tienen secuencias muy parecidas del gen de la ADN Polimerasa III.

Cuadro 7. Divergencias evolutivas calculadas para las distintas cepas seleccionadas con otras especies del género *Bacillus* y cepas conocidas de *B. thuringiensis* utilizando los nucleótidos del gen de una subunidad de la ADN polimerasa III. Las distancias fueron calculadas con el programa MEGA 4 con el modelo p-distance. Se analizaron un total de 680 posiciones.

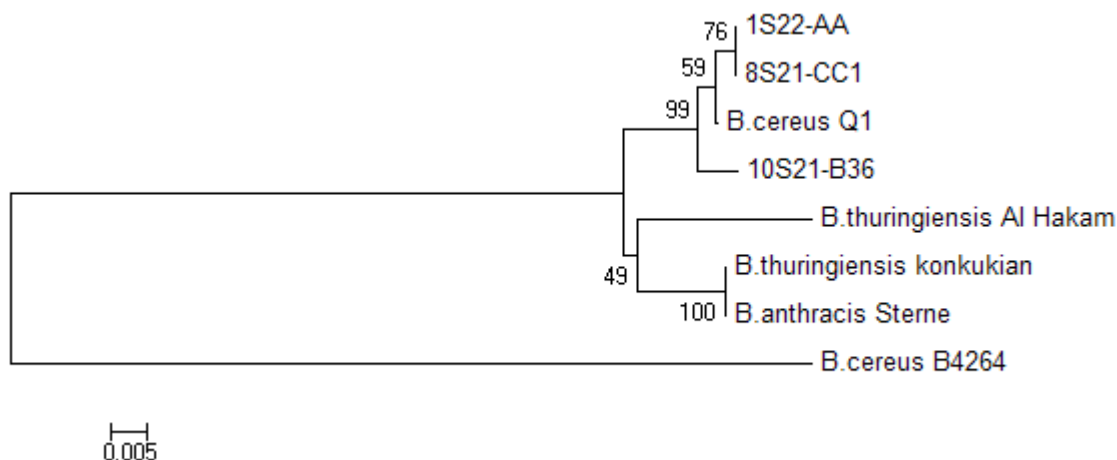
		1	2	3	4	5	6	7
1	10S21-A11							
2	3S24-C13	0.028						
3	<i>B. cereus</i> / ATCC10987	0.012	0.034					
4	<i>B. thuringiensis</i> / <i>konkukian</i>	0.040	0.035	0.028				
5	<i>B. anthracis</i> / A0248	0.041	0.037	0.029	0.001			
6	<i>B. thuringiensis</i> / Al Hakam	0.041	0.037	0.029	0.001	0.003		
7	<i>B. wiehenstephanensis</i> KBAB4	0.082	0.088	0.071	0.074	0.075	0.075	

Cuadro 8. Divergencias evolutivas calculadas para las distintas cepas seleccionadas con otras especies del género *Bacillus* y cepas conocidas de *B. thuringiensis* utilizando la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen de una subunidad de la ADN polimerasa III. Las distancias fueron calculadas con el programa MEGA 4 con el modelo p-distance. Se analizaron un total de 226 posiciones.

		1	2	3	4	5	6	7
1	10S21-A11							
2	3S24-C13	0.040						
3	<i>B. cereus</i> / ATCC10987	0.022	0.044					
4	<i>B. thuringiensis</i> / <i>konkukian</i>	0.049	0.040	0.027				
5	<i>B. anthracis</i> / A0248	0.053	0.044	0.031	0.004			
6	<i>B. thuringiensis</i> / Al Hakam	0.049	0.040	0.027	0.000	0.004		
7	<i>B. wiehenstephanensis</i> KBAB4	0.066	0.066	0.044	0.031	0.035	0.031	

Se calculó la divergencia evolutiva de las cepas analizadas con la de las especies de *Bacillus* y cepas de *B. thuringiensis* de referencia utilizando el modelo p-distance. El modelo divide la cantidad de bases (o aminoácidos en el caso de analizar la proteína) diferentes con la secuencia a la que se la está comparando y lo divide en el total de bases analizadas. Las divergencias utilizando nucleótidos y proteínas demuestran que las cepas analizadas se encuentran evolutivamente más cerca de *B. cereus* que a las cepas de *B. thuringiensis* de referencia para el caso de la subunidad de la ADN Polimerasa III.

Figura 12. Relaciones filogenéticas entre 3 especies presuntivas de *B. thuringiensis* aisladas de la filosfera del árbol de aguacate con respecto a otras dos cepas de *B. thuringiensis* y cepas de *B. anthracis*, *B. cereus* utilizando una porción del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa. Se encontró que las secuencias obtenidas de las cepas seleccionadas que amplificaron para ese gen únicamente contenían relación con las especies de *Bacillus* anteriormente mencionadas. El árbol concenso fue construido utilizando el modelo de Neighbour Joining y Bootstrapping utilizando el programa computacional MEGA 4.



En el caso del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa (Figura 11) se obtuvieron resultados parecidos al gen de la ADN Polimerasa III. Las cepas presuntivas seleccionadas de *B. thuringiensis* muestran una alta similitud a la cepa de *B. cereus*, como observado en el caso anterior. Debido a que este gen no se encontró en ninguna otra cepa de *Bacillus* la cepa B4264 es la que muestra mayor distancia de las analizadas, sin embargo esta distancia es pequeña.

Cuadro 9. Divergencias evolutivas calculadas para las distintas cepas seleccionadas con otras especies del género *Bacillus* y cepas conocidas de *B. thuringiensis* utilizando los nucleótidos del gen la alcohol deshidrogenasa. Las distancias fueron calculadas con el programa MEGA 4 con el modelo p-distance. Se analizaron un total de 304 posiciones.

		1	2	3	4	5	6	7	8
1	1S22-AA1								
2	8S21-CC1	0.000							
3	10S21-B36	0.010	0.010						
4	<i>B. cereus</i> Q1	0.003	0.003	0.010					
5	<i>B. thuringiensis</i> konkukian	0.030	0.003	0.030	0.026				
6	<i>B. anthracis</i> Sterne	0.030	0.030	0.030	0.026	0.000			
7	<i>B. cereus</i> B4264	0.211	0.211	0.211	0.207	0.211	0.211		
8	<i>B. thuringiensis</i> Al Hakam	0.043	0.043	0.043	0.039	0.036	0.036	0.217	

Cuadro 10. Divergencias evolutivas calculadas para las distintas cepas seleccionadas con otras especies del género *Bacillus* y cepas conocidas de *B. thuringiensis* utilizando la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen la alcohol deshidrogenasa. Las distancias fueron calculadas con el programa MEGA 4 con el modelo p-distance. Se analizaron un total de 101 posiciones.

		1	2	3	4	5	6	7	8
1	1S22-AA1								
2	8S21-CC1	0.000							
3	10S21-B36	0.020	0.020						
4	<i>B. cereus</i> Q1	0.010	0.010	0.020					
5	<i>B. thuringiensis</i> konkukian	0.040	0.040	0.030	0.030				
6	<i>B. anthracis</i> Sterne	0.040	0.040	0.030	0.030	0.000			
7	<i>B. cereus</i> B4264	0.277	0.277	0.267	0.267	0.027	0.267		
8	<i>B. thuringiensis</i> Al Hakam	0.069	0.069	0.059	0.040	0.040	0.040	0.267	

Las divergencias evolutivas calculadas a partir de la porción del gen de la alcohol deshidrogenasa da resultados similares a las divergencias calculadas con la porción del gen de la subunidad de la ADN Polimerasa III. Las cepas analizadas son más cercanas a *B. cereus*.

Es importante mencionar que las divergencias evolutivas y árboles filogenéticos se realizaron utilizando varios modelos mas (Jukes Kantor, Tajima Nei, Tamura Nei) además del presentado. Todos los modelos generaban divergencias y árboles filogenéticos muy similares.

Uno de los fragmentos clonados de la cepa 3S24 presentaba una similitud al plásmido de *B. thuringiensis* pALH1 con un E-value de 5.00×10^{-11} . Este plásmido ha sido reportado únicamente en la cepa Al Hakam de *B. thuringiensis*. También se reportó que esta cepa no contenía en su genoma ningún gen *cry* codificado.

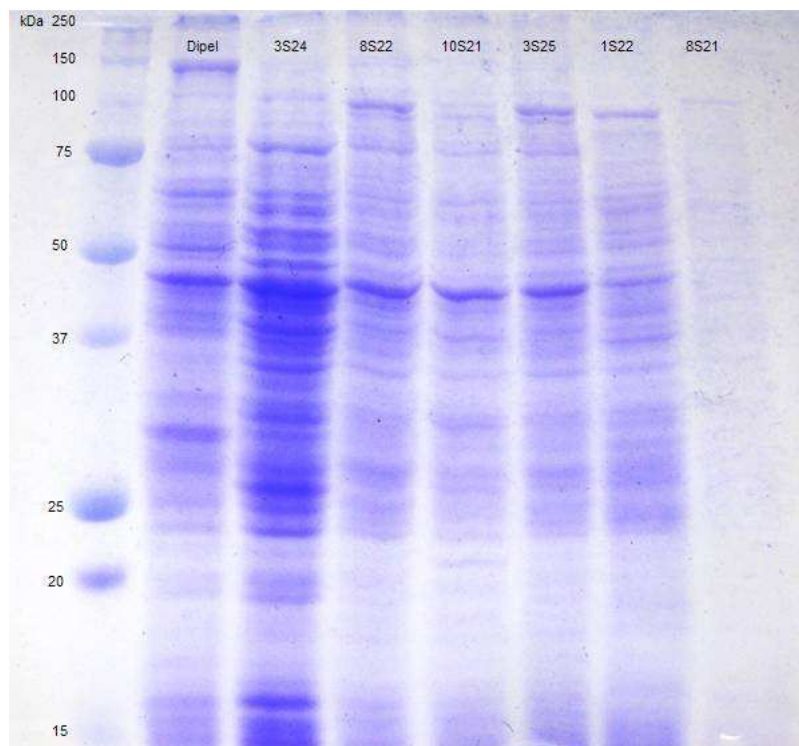
G. Análisis del patrón de proteínas de las distintas cepas presuntivas de *B. thuringiensis*.

El análisis de patrón de proteínas de las cepas y del control Dipel se realizó por medio de SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 12 se logró obtener proteínas claramente visibles en 6 de las 7 muestras analizadas. En el caso de Dipel® se observa una banda entre 100 y 150 kDa (Figura 12). Se ha reportado que las proteínas del grupo CryI (Höfte y Whiteley 1989) tienen una masa molecular de aproximadamente 130 kDa. La cepa de *B. thuringiensis* utilizada en el biopesticida comercial expresa únicamente las proteínas CryIA(a) y CryIA(c). Por lo anterior, se puede decir que la banda que se observa entre 100 y 150 kDa en el carril de Dipel pertenece a

toxinas codificadas por genes *cryIA*. En ninguna de las cepas analizadas se presenta la misma banda por lo que es posible que las cepas no expresen proteínas del tipo CryI.

Las proteínas CryII y CryIII tienen una masa molecular de aproximadamente 70 kDa. En las cepas analizadas se observan bandas que no se observan en el control que únicamente expresa proteínas del tipo CryI. Por esto, es posible que las cepas expresen proteínas del tipo CryII y/o CryIII.

Figura 13. SDS-PAGE (revelado con azul de Coomassie) de las 6 cepas presuntivas analizadas de *B. thuringiensis*. Pozo 1: marcador molecular (Bio-Rad® All Blue); pozo 2: control positivo Dipel®; pozo 3-8: proteínas extraídas de 6 distintas cepas presuntivas de *B. thuringiensis* (3S24, 8S22, 10S21, 3S25, 1S22 y 8S21).



Las proteínas CryIV presentan masas moleculares diversas (desde 70 a 130 kDa) por lo que es posible que las cepas también expresen proteínas de este grupo. Sin embargo, sin análisis molecular de los genes codificados en las bacterias no se puede asegurar que las cepas expresen o no expresen cualquier tipo de proteína Cry.

La tinción adecuada para el análisis realizado fue la de azul de Coomassie debido a que la tinción de plata presentaba una sensibilidad muy alta a las proteínas haciendo que no se tiñeran bandas bien definidas (no se muestran resultados).

H. Análisis de patrón de plásmidos de cepas presuntivas seleccionadas de *B. thuringiensis*.

Los plásmidos obtenidos de las cepas presuntivas seleccionadas de *B. thuringiensis* presentaban un peso molecular alto (>10 kb) por lo que se realizó una electroforesis en gel de agarosa con un porcentaje de gel bajo (6%) durante 24 horas a un voltaje bajo (10V) a 4°C. Sin embargo, los plásmidos no se pudieron separar debido a que probablemente todos presentan pesos muy similares. Por esto, no se pudo obtener un patrón de plásmidos y por consiguiente, no se realizó el análisis de patrón de plásmidos.

VIII.DISCUSIÓN

Las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* seleccionadas se les cultivo en un caldo nutritivo. Debido a que estas cepas habían sido aisladas con anterioridad, el uso de un medio de cultivo selectivo era innecesario. Se comprobó únicamente que las cepas obtenidas fueran Gram positivo por lo anteriormente mencionado.

Al extraer el ADN de las cepas por medio de los kits que utilizaban una lisis química, se pudo observar que el ADN obtenido (Cuadro 5) era de baja concentración y calidad. Además, las muestras de ADN extraídas de esta manera fallaban en amplificar ADN durante la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando los cebadores OL1F/OL5R. Lo anterior probablemente se debe a que la bacteria había enfrentado estrés nutritivo durante el crecimiento en el medio y se había iniciado el proceso de esporulación. La espora de los miembros del género *Bacillus* contiene compuestos en su exterior que la hacen muy resistente a cambios físicos y químicos. Por esto, es probable que la cantidad de ADN extraído fuera tan baja.

El mejor método para la extracción de ADN fue el que involucraba el uso de la resina Chelex-100 (Sigma). La resina eliminaba los cationes divalentes que eran necesarios para el funcionamiento de las nucleasas, por lo que la integridad del ADN era protegida. La lisis por calor permitió obtener un ADN de calidad suficiente como para poder amplificar ADN necesario para la clonación.

Las cepas de las cuales se pudo amplificar ADN por PCR presentaban al menos 2 bandas por amplificación, por lo que la clonación era necesaria para separar los fragmentos y secuenciar por separado. Inicialmente se realizó una prueba con una sola cepa para determinar qué proporción inserto:vector era la adecuada para ligar los fragmentos al vector de clonación. Los resultados obtenidos indicaron que las tres distintas proporciones inserto:vector utilizadas ligaban distintos insertos al vector, por lo que la utilización de las tres proporciones fue necesaria para las cepas restantes.

Para la selección de bacterias transformadas con vectores que incluían insertos se utilizó la discriminación blanco/azul que provee la alfa-complementación del vector y la cepa de *E. coli* utilizada. Las pruebas iniciales involucraban el uso del sustrato cromogénico (X-gal) y el inductor gratuito (IPTG) en todos los medios selectivos utilizados. Sin embargo, se notó que las colonias

de las bacterias que presentaban vectores con insertos crecían de una manera más lenta y pequeña. Esto se debe a que la expresión del inserto provocaba cierta toxicidad hacia la bacteria. Por lo anterior, para el resto de las cepas la siembra de los transformados se realizó en duplicado. Un duplicado contenía el X-gal e IPTG y el otro no. El medio que contenía el X-Gal e IPTG servía para determinar que bacteria tenía vectores interrumpidos por insertos y cuáles no. Mientras que el medio que no tenía estas moléculas servía para las pruebas subsecuentes como el tamizaje por PCR o para la extracción de plásmidos.

Se utilizaron dos métodos distintos para el tamizaje de colonias obtenidas por la transformación. El primer método era un PCR utilizando los cebadores M13/pUC debido a que el sitio de policlonación del vector se encontraba rodeado de estas secuencias. La extracción de ADN de cada clon era innecesaria debido a que una colonia era directamente inoculada en el master mix. El segundo consistía en la extracción de los plásmidos recombinantes y la estimación de sus pesos por una electroforesis en gel de agarosa. El método que mas información proveía acerca de los insertos era el PCR con cebadores M13/pUC. Con el segundo método se podía discriminar únicamente plásmidos que contenían insertos muy grandes (>600 pb). Por lo anterior, se eligió el método de tamizaje por PCR debido a que se pudo estimar el tamaño de los insertos en cada vector.

Las secuencias obtenidas no presentaron similitud alguna con la de los genes *cry* almacenados en la base de datos del NCBI. Esto muy probablemente se debe a las condiciones en la que se llevo a cabo la amplificación, utilizando los cebadores dirigidos en contra de secuencias consenso de los genes *cry*. Por lo anterior, fue imposible determinar qué cepas contenían genes *cry* y contra que insectos plaga se podían utilizar. Sin embargo, como se observa en la Figuras 4 y 5, el patrón de bandas amplificadas en el control Dipel difiere en gran medida del patrón de amplificación obtenido en las cepas analizadas. Además, Berón (2005) reporta el patrón de bandas amplificadas para *B. thuringiensis* var *kurstaki* (Dipel), siendo este muy similar al observado en las Figuras 4 y 5. Por lo anterior, es posible que la amplificación de genes *cry* si se haya llevado a cabo en el control y no en las cepas analizadas. Sin embargo, esto no se puede corroborar debido a que los fragmentos obtenidos del control no fueron clonados.

La posible amplificación de genes *cry* en el control y no en las cepas analizadas podría deberse a la ausencia de genes *cry* en las cepas seleccionadas, favoreciendo la amplificación de

los genes obtenidos. La ausencia de genes *cry* en las cepas analizadas podría significar que las cepas no son *B. thuringiensis*.

El análisis filogenético de las cepas se realizó utilizando los genes que amplificaron por medio de PCR. Los genes amplificados son un dominio de la ADN Polimerasa III y alcohol deshidrogenasa. Se ha reportado en otras especies del género *Bacillus* (Sanjanwala y Ganesan 1989) que la ADN polimerasa III es la enzima principal utilizada en la célula para la replicación de ADN. Por lo anterior, es posible que la enzima se encuentre bajo una gran presión selectiva lo cual provoque una tasa de mutación muy baja. Si este es el caso, el análisis de la distancia evolutiva de las distintas cepas y especies no es preciso. De igual manera, el gen de la alcohol deshidrogenasa podría proveer información limitada para realizar un análisis filogenético.

Además, se ha mencionado con anterioridad que la separación de especies entre el grupo 1 de bacilos (*B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis*) utilizando únicamente métodos moleculares es muy difícil. Asimismo, se ha sugerido que *B. thuringiensis* es un *B. cereus* que contiene plásmidos que codifican para las toxinas Cry. Esto podría explicar la razón de porque las cepas analizadas se encuentran relacionadas con *B. cereus*.

Debido a lo anterior, no se puede concluir si las cepas analizadas pertenecen a la especie *B. thuringiensis* o a alguna de las otras especies del grupo 1 de bacilos. La técnica utilizada no provee la suficiente información para separar las cepas analizadas de las demás especies.

Una secuencia obtenida de un fragmento perteneciente a la cepa 3S24 presentaba una alta similitud a una fracción de la secuencia del plásmido pALH1. Este plásmido únicamente ha sido reportado en la cepa Al Hakam de *B. thuringiensis* (Challacombe *et al* 2007). La cepa Al Hakam fue obtenida por la Comisión Especial de las Naciones Unidas en Iraq en un sitio donde se sospechaba se producían armas biológicas (Radnedge *et al* 2003). Challacombe *et al* (2007) reporta que la cepa no contiene genes *cry* en su genoma. Sin embargo, menciona que los plásmidos que codifican estas proteínas pudieron haberse perdido durante el cultivo. Además, se hace mención que la cepa está más relacionada filogenéticamente a *B. anthracis* que a cepas de *B. thuringiensis* de importancia comercial. Como se ha mencionado con anterioridad, la clasificación de las bacterias del grupo bacilo 1 es complicada debido a la gran similitud en el genoma de estas. Por lo anterior, es posible que la cepa 3S24 sea *B. thuringiensis* pero no

contenga genes *cry* debido a la posible pérdida de los plásmidos durante el cultivo. Además es posible que la cepa este más relacionada a *B. anthracis* que *B. thuringiensis*.

Con respecto al análisis de patrón de proteínas de cepas se encontró una banda en el control Dipel entre 100 y 150 kDa que muy probablemente pertenezca a las proteínas CryIA que expresa dicha bacteria. No se encontró esta banda en ninguna de las cepas analizadas por lo que es posible que estas cepas no expresen genes *cryIA*. Las proteínas tipo CryII, Cry III y CryIV son proteínas de masas variadas y el patrón de proteínas únicamente no provee la información necesaria para determinar si estas cepas expresan toxinas o no.

IX. CONCLUSIONES

1. El análisis realizado utilizando los genes amplificados no provee suficiente información para determinar la especie de las cepas analizadas.
2. La cepa 3S24 contiene una secuencia de ADN muy similar (E-value < 0.05) al plásmido pALH1 únicamente reportado en *B. thuringiensis* cepa Al Hakam.
3. No se logró identificar ningún gen *cry* en las cepas analizadas y por consiguiente el análisis filogenético utilizando estos genes y la predicción de las familias de insectos afectadas por estas toxinas no se pudo llevar a cabo.
4. Las distintas cepas presuntivas de *B. thuringiensis* fueron cultivadas exitosamente en medio nutritivo.
5. El mejor método en este estudio para extraer ADN de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* es el método Chelex propuesto por Roche (2008) debido a que provee ADN de calidad suficiente para poder ser amplificado por PCR.
6. No se pueden amplificar genes *cry* por medio de PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R con las condiciones propuestas en este estudio en las cepas seleccionadas.
7. Las proporciones inserto:vector 1:3, 1:1 y 3:1 son todas necesarias para ligar los fragmentos amplificados por PCR utilizando cebadores OL1F/OL5R.
8. El método más eficiente y que mas información provee para determinar el tamaño del inserto en los clones es del PCR utilizando cebadores pUC/M13.
9. Las cepas presuntivas analizadas de *B. thuringiensis* muy probablemente no expresen proteínas del tipo CryIA como las encontradas en *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Dipel). Por lo anterior, se concluye que las cepas analizadas no provienen de aplicaciones, por parte de los agricultores, de Dipel en los sitios donde las cepas fueron aisladas.

X. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar el PCR utilizando los cebadores OL1F/OL5R únicamente con plásmidos de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* para evitar que se amplifiquen regiones del genoma no asociadas a genes *cry*.
2. Se recomienda clonar genes del control Dipel y secuenciar dichos fragmentos antes de clonar genes de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis* aisladas para asegurarse que se amplifican los genes de interés y no otros sitios en el genoma de la bacteria.
3. Es importante optimizar el PCR de genes *cry* para lograr obtener fragmentos pertenecientes a los genes de interés. Esto se podría realizar por medio de un touchdown PCR utilizando plásmidos extraídos de las cepas presuntivas de *B. thuringiensis*.
4. Se recomienda utilizar los demás cebadores propuestos por Berón (2005) para asegurarse que el fragmento amplificado con el primer PCR pertenezcan a genes *cry*.
5. Se debe idear otra metodología para separar los plásmidos de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* debido a que la propuesta en este documento no fue eficiente para separar dichos plásmidos debido a su muy similar peso molecular.
6. Se recomienda utilizar otros métodos para determinar si las cepas pertenecen a la especie *B. thuringiensis*. Por ejemplo, se podrían utilizar anticuerpos para la tipificación por medio de flagelo.
7. Se debe realizar un PCR utilizando cebadores no degenerados para detectar genes *cryIII* debido a que las proteínas codificadas por estos genes podrían ser potencialmente utilizadas en contra de una de las principales plagas del aguacate. Además, si se logran detectar estos genes la cepa se podría clasificar como *B. thuringiensis*.
8. Es importante analizar el resto de las 176 cepas presuntivas de *B. thuringiensis* para confirmar la presencia de genes *cry* que codifiquen para potenciales toxinas insecticidas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

LITERATURA CITADA

Adams L.F.; K.L. Brown y H.R. Whiteley. 1991. *Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a B. thuringiensis crystal protein gene promoter*. Journal of Bacteriology. 173:3846-3854.

Agaisse, H. y D. Lereclus. 1995. *How Does B. thuringiensis Produce So Much Insecticidal Crystal Protein?* Journal of Bacteriology. 177(21): 6027-6032.

Andersen G.; J.M. Simchock y K.H. Wilson. 1995. *Identification of a region of genetic variability among Bacillus anthracis strains and related species*. Journal of Bacteriology. 178: 377-384.

Anónimo. 2009. *The NCBI handbook: The BLAST Sequence Analysis Tool*. Consultado el 22 de febrero del 2010 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=handbook&part=ch16>

Ash C.; J. Farrow; M. Dorsch; E. Stackenbrandt y M. Collins. 1991. *Comparative analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and related, species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA*. International Journal of Systematic Bacteriology. 41: 343-346.

Asociación Nacional de Café. 2004. *Cultivo de aguacate*. Programa de Diversificación de Ingresos de la Empresa Cafetalera.

Baumann L.; K. Okamoto; B. Unterman; M. Lynch y P. Baumann. 1984. *Phenotypic characterization of Bacillus thuringiensis and B. cereus*. Journal of Invertebrate Pathology. 44:329-341.

- Ben-Dov E.; A. Zaritsky; E. Dahan; Z. Barak; R. Sinai; R. Manasherob; A. Khameaev; E. Troitskaya; A. Dubitsky; N. Berenzina y Y. Margalith. 1997. *Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field collected strains of B. thuringiensis*. Applied Environmental Microbiology. 63: 4883-4890.
- Bernhard K. 1986. *Studies on the delta-endotoxin of B. thuringiensis ver. Tenebrionis*. FEMS Microbiology Lett. 33: 261-265.
- Berón C. M.; L. Curatti y Salerno G. L. 2005. *New Strategy for Identification of Novel cry-Type Genes from B. thuringiensis Strains*. Applied and Environmental Microbiology. 71(2): 761-765.
- Black W. y S. Barker. 2005. *Systematic Relationships Among Disease Vector*. Biology of Disease Vectors. Elsevier.
- Bourque S.N.; J.R. Valéro; J. Mercier; M.C. Lavoie y R.C. Levesque. 1993. *Multiplex polymerase chain reaction for detection of differentiation of the microbial insecticide B. thuringiensis*. Applied Environmental Microbiology. 59: 523-527.
- Bravo A., S.S. Gil y M. Soberón. 2006. *Mode of action of B. thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. Toxicon 49(4): 423-435.
- Bravo A.; S. Sarabia; L. Lopez; H. Ontiveros; C. Abarca; A. Ortiz; M. Ortiz; L. Lina; F.J. Villalobos; G. Peña; M.E. Nuñez Valdez; M. Soberón y R. Quintero. 1998. *Characterization of cry genes in Mexican B. thuringiensis strain collection*. Applied Environmental Microbiology. 64: 4965-4972.
- Brown K.L. y H.R. Whiteley. 1988. *Isolation of a B. thuringiensis RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes*. Proceedings of the National Academy of Science. 85: 4166-4170.

- Brown K.L. y H.R. Whiteley. 1990. *Isolation of the second B. thuringiensis RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter*. Journal of Bacteriology. 172: 6682-6688.
- Brown T.A. 2001. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Blackwell Science Ltd. Oxford. 363 páginas.
- Carlson C.; T. Johansen; M. Lecadet y A. Kolsto. 1996. *Genomic organization of the entomopathogenic bacterium Bacillus thuringiensis subsp. Berliner 1715*. Microbiology. 142: 1625-1634.
- Carozzi N.B.; V.C. Kramer; G.W. Warren; S. Evola y M.G. Koziel. 1991. *Prediction of insecticidal activity of B. thuringiensis strains by polymerase chain reaction product profiles*. Applied Environmental Microbiology. 57: 3056-3061.
- Cerón J.; L. Covarrubias; R. Quintero; A. Ortíz; M. Ortíz; E. Araneda; L. Lina y A. Bravo. 1994. *PCR analysis of the CryI insecticidal family genes from B. thuringiensis*. Applied Environmental Microbiology. 50: 353-356
- Chalacombe M. R. Altherr; G. Xie; S. S. Bhotika; N. Brown; D. Bruce; C. S. Campbell; M. L. Campbell, J. Chen; O. Chertkov; C. Cleland; M. Dimitrijevic; N. A. Doggett; J. J. Fawcett; T. Glavina; L. A. Goodwin; L. D. Green; C. S. Han; K. K. Hil; P. Hitchcock; P. J. Jackson; P. Keim; A. R. Kewalramani; J. Longmire; S. Lucas; S. Malfatti; D. Martinez; K. McMurry; L. J. Meincke; M. Misra; B. L. Moseman; M. Mundt; A. C. Munk; R. T. Okinaka; B. Quintana; L. P. Reilly; P. Richardson; D. L. Robinson; E. Saunders; R. Tapia; J. G. Tesmer; N. Thayer; L. S. Thompson; H. Tice; L. O. Ticknor; P. L. Wills; P. Gilna y T. S. Brettin. 2007. *The Complete Genome Sequence of Bacillus thuringiensis Al Hakam*. Journal of Bacteriology. 189(9): 3680-3681.
- Cohan F. 2002. *What are bacterial species?* Annual Reviews in Microbiology. 56: 457-487.

- Coria V.; A. Pescador; E. López; R. Lezama; R. Salgado; M. López; A. Vidales y J. Muñoz. 2007. *Autoecología del Barrenador de Ramas Copturus aguacatae Kissinger (Coleoptera: Curculionidae) del Aguacate en Michoacán México*. Proceedings VI World Avocado Congress. Viña del mar, Chile. Pp 12-16.
- Crickmore N.; D.R. Zeigler; J. Feitelson; E. Schnepf; J. Van Rie; D. Lerenclus; J. Baum y D.H. Dean. 1998. *Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 807-813.
- Davis J. y F. Jacob. 1968. *Genetic mapping of the regulator and operator genes of the lac operon*. Journal of Molecular Biology. 36: 413-417.
- Davis A.; P. Mascolo y M. Quinn. 1998. *Rapid Minipreparation of Plasmid DNA for Screening Multiple Colonies*. Biotechniques. 26(1): 66-68.
- Feitelson J.S.; J. Payne y L. Kim. 1999. *B. thuringiensis: insects and beyond*. Biotechnology. 10:281-275
- Ferrandis M.D.; V.M. Juárez-Pérez, R. Frutos; Y. Bel y J. Ferré. 1999. *Distribution of cryI, cryII, and cryV genes within B. thuringiensis from Northern Victoria Land, Antarctica*. Letter in Applied Microbiology. 30: 263-266.
- Fox, G.; E. Wisotzkey; J.D. Jurtshuk y P. Jr. 1992. *How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity*. International Journal of Systematic Bacteriology. 42: 166-170.
- Gevers D.; F. Cohan; J. Lawrence; B. Spratt; T. Coenye; E. Feil; E. Stackebrandt; Y. Van de Peer; P. Vandamme; F. Thompson y J. Swings. 2005. *Re-evaluating prokaryotic species*. Nature Reviews Microbiology. 3: 733-739.

- Glatron M.F. y G. Rapoport. 1972. *Biosynthesis of the parasporal inclusion of B. thuringiensis: half-life of its corresponding messenger RNA*. *Biochemistry*. 54: 1291-1301.
- Guo B. y Y. Bi. 2002. *Cloning PCR products. An Overview*. En: *Methods in Molecular Biology*. Vol 192: PCR Cloning Protocols. Segunda Edición. Humana Press Inc. Towota, New Jersey. Pp. 111-119.
- Helmann J.D. y M.J. Chamberlin. 1988. *Structure and function of bacterial sigma factor*. *Annual Reviews of Biochemistry*. 57: 839-872.
- Höfte, H. y H.R. Whiteley. 1989. *Insecticidal crystal proteins of B. thuringiensis*. *Microbiology Reviews*. 53: 242-255.
- Horwitz J.P.; J. Chua; R.J. Curby; A.J. Tomson; M.A. DaRooge; B.E. Fisher; J. Mauricio y I. Klundt. 1964. *Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D-glycopyranosides*. *Journal of Medical Chemistry*. 7: 574-575.
- Hue K.K.; S.D. Cohen y D.H. Bechhofer. 1995. *A polypurine sequence that acts as a 5' mRNA stabilizer in Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 177: 319-327.
- Juárez-Pérez V.M.; M.D. Ferrandis y R. Frutos. 1997. *PCR based-approach for detection of novel B. thuringiensis cry genes*. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 2997-3002.
- Kolmodin L. y D. Birch. 2002. *Polymerase Chain Reaction. Basic Principles and Routine Practice*. En: *Methods in Molecular Biology*. Vol 192: PCR Cloning Protocols. Segunda Edición. Humana Press Inc. Towota, New Jersey. Pp. 3-18.

- Li J.; J. Carroll y D.J. Ellar. 1991. *Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from B. thuringiensis at 2.5 Å resolution*. Nature. 353: 815-821.
- MAGA. 2005. MAGActual. *La Revista del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación*. Año 02. No. 13. 17 pp. Consultada el 19 de noviembre del 2008 en: http://www.maga.gob.gt/maga_content/magactual/2005novdic/index.htm
- Porcar M. y V. Juárez-Pérez. 2003. *PCR-based identification of B. thuringiensis pesticidal crystal genes*. FEMS Microbiology Reviews. 26: 419-432
- Porcar M.; J. Iriarte; V. Cosmao Dumanoir; M.D. Ferrandis; M.-M. Lecadet; J. Ferré y P. Caballero. 1999. *Identification and characterization of the new B. thuringiensis serovars pirenaica (serotype H57) and iberica (serotype H59)*. Journal of Applied Microbiology. 87: 640-648.
- Radnedge L.; P. Agron; K. Hill; P. Jackson; L. Ticknor; P. Keim y G. Andersen. 2003. *Genome Differences That Distinguish Bacillus anthracis from Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. 69(5): 2755-2764.
- Roche D. 2008. *Caracterización de la biodiversidad de cepas de B. thuringiensis en distintos nichos de la filoesfera del árbol del aguacate en Guatemala*. Tesis, Universidad del Valle de Guatemala. 118 pp.
- Roh J.; J. Choi; S. Li; J. Byung y J. Yeon 2007. *Bacillus thuringiensis as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control*. Journal of Microbiology and Biotechnology 17(4): 547-559.
- Ruiz de Escudero I; A. Estela; M. Porcar; C. Martienz; J. Oguiza; B. Escriche; J. Ferré y P. Caballero. 2006. *Molecular and insecticidal characterization of a CryII protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae*. Applied and Environmental Microbiology 72(7):4796-804.

- Sambrook J. y D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 2331 páginas.
- Stackenbrandt E; W. Frederiksen; G. M. Garrity; P. Grimont; P. Kampf; M. Maiden; X. Nesme; R. Rossello-Mora; J. Swings; H. G. Truper; L. Vauterin; A. C. Ward y W. B. Whitman. 2002. *Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology*. International Journal of Systematic Evolution of Microbiology. 52: 1043-1047.
- Ticknor L.; A. Kolsto; K. Hill; P. Keim; M. Laker; M. Tonks y P. Jackson. 2001. *Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis Soil Isolates*. Applied and Environmental Microbiology. 67(1):4863-4873.
- Ullmann A.; F. Jacob y J. Monod. 1967. *Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to and operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology. 24: 339-343.
- Vandamme P.; B. Pot; M. Gillis; P. de Vos; K. Kersters y J. Swings. 1996. *Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic*. Microbiology reviews. 60: 407-438.
- Vásquez, J.S. 1999. *Recomendaciones Técnicas para el Cultivo de Aguacate*. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA). Sección de Publicaciones de Plantas y Animales. Frutales. Consultada el 19 de noviembre del 2008 en: http://www.icta.gob.gt/reco_frutales.htm
- Wong H.C. y S. Chang. 1986. *Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria*. Proceedings of the National Academy of Science. 83: 3233-3237

Wong H.C.; H.E. Schnepf y H.R. Whiteley. 1983. *Transcriptional and translational start sites for the B. thuringiensis crystal protein gene*. Journal of Biological Chemistry. 258: 1960-1967.

REFERENCIAS CONSULTADAS

Agaisse H. y Lereclus D. 1995. *How Does B. thuringiensis Produce So Much Insecticidal Crystal Protein?*. Journal of Bacteriology. 177(21): 6027-6032.

Ben-Dov E; A. Zaritsky; E. Dahan; Z. Barak; R. Sinai; R. Manasherob; A. Khamraev; E. Troitskaya; A. Dubitsky; N. Berezina y Y. Margalith 1997. *Extended Screening by PCR for Seven cry-Group Genes from Field-Collected Strains of B. thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. 63(12):4883-4809

Chen M; J. Zhao; H. L. Collins; E.D. Earle; J. Cao y A.M. Shelton. 2008. *A critical assessment of the effects of B. thuringiensis transgenic plants on parasitoids*. PLoS ONE 3(5) 2284.

Grossi-de-Sa M.F. 2007. *Susceptibility of Anthonomus grandis (cotton boll weevil) and Spodoptera frugiperda (fall armyworm) to a cryIia-type toxin from a Brazilian B. thuringiensis strain*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 40(5):773-82.

Ibarra J. 2003. *Diversity of B. thuringiensis Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species*. Applied and Environmental Microbiology.69(9):5269-5274.

Kati H; K. Sezen; R. Nalcacioglu y Z. Demirbag. 2007. *A highly pathogenic strain of B. thuringiensis serovar kurstaki in lepidopteran pests*. Jour Microbiology 45(6):553-7

- Masson L; M. Erlandson; M. Puzstai-Carey; R. Brousseau; V. Juárez-Pérez y R. Frutos. 1998. *A Holistic Approach for Determining the Entomopathogenic Potential of B. thuringiensis Strains*. Applied and Environmental Microbiology. 64(12): 4782-4788
- Nair M.S. y D.H. Dean. 2008. *All domains of CryIA toxins insert into insect brush border membranes*. Journal of Biological Chemistry. 283: 26324-26331.
- Oliveira M.S. 2006. *Biological activity of B. thuringiensis strains against larvae of the blowfly Chrysomya putoria (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)*. Neotropical Entomology 35(6):849-52.
- Pigott C.R. y D.J. Ellar. 2007. *Role of receptors in B. thuringiensis crystal toxin activity*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71(2):255-81.
- Porter A.G.; E.W. Davidson y J.W. Liu. 1993. *Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes*. Microbiology Reviews 57(4):838-61.
- Rosas-García N.M.; M. Mireles-Martínez; J.L. Hernández-Mendoza y J.E. Ibarra. 2007. *Screening of cry gene content of Bacillus thuringiensis strains isolated from avocado orchards in Mexico, and their insecticidal activity towards Argurotaenia sp (Lepidoptera: Tortricidae) larvae*. Journal of Applied Microbiology. 104(1): 224-230.
- Soufiane B. y Cote J. 2008. *Discrimination among B. thuringiensis H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, gyrB and aroE gene sequence analyses*. Antonie van Leeuwenhoek. 95:33-45
- Zhang X; M. Candas; N. Griko; R. Taussig y L. Bulla. 2006. *A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the CryIAb toxin of B. thuringiensis*. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America 103(26):9897-902.

XII ANEXOS

Cuadro 11. Secuencia consenso de los fragmentos secuenciados. Se indica la cepa de donde se amplificó el fragmento, la identificación del fragmento y el gen con el que mayor tuvieron similitud según la base de datos “nucleotide collection” del NCBI.

Cepa	Fragmento	Secuencia (5'→3')	Gen*
10S21	A11	TAGTGATTTAACACCATACGCACAGGCAGCAAATTTTCATTAGCGTTGATTCTATTTTTGTCCTCTAA TATATTAAGAGAGCTGATACAATGCGCTTCTGAGCGTAGGAGAAAAGATTCAAACATCTCTTTCTGC TCATGAAAAACAAGACGATCTTCTTCTCCAAGTTGAACATATAATAAATCCTTATAAATAAGGAGTA ACATATCTAAACCTTGCTGTAATTGTTCTTTCTCCTCAAAGTGTTCCTCCCATTTTTCTGTACAAAA AAACAGAGGCTTTATCTTTTTCGAGCGCTTCACATAATTTTACTAAAGCTCGTGCTTGTGCAAAC CATTCACTACTACATAAAGCTAAAGCTTCATCAAACTATTTGTGAGTTGTGCAGCAAGTGTGCGATA AAGATGTCGTAACACCTTCATCCTGTAATCTTCTAATTAAGATTCCGTAGGTAACGGTCTAAATGTA ACAACCTTGACAACGAGATAAAATCGTATTTAAATTTGATGACTTTGTTTCAGTAAGTAAATAGCTG TTGTACTACTTGGTCTTCTAATAAATTTCAACAGTGTATTCGCCGATTTGCTGTCATACGGTCTG CGTGCTCAATAACATATACTTTTTATTGCTTCTAATCCTGTTTTGAAAACCTTCTTGTAAATCAT GAATTTGCTGCTTCTTAATAG	A
10S21	A17	AGTATATGTTATTGAGCACGCAGACCGTATGACAGTAAATGCGGCGAATACACTGTTGAAATTTTTA GAAGAACCAAGTAGTGATACAACAGCTATTTTACTTACTGAACAAAAGTCATCAAATTTTAAATACGA TTTTATCTCGTTGTCAAGTTGTTACATTTAGACCGTTACCTACGGAATCTTTAATTAGAAGATTACAG GATGAAGGTGTTACGACATCTTTATCGACACTTGTGTCACAACCTCACAAATAGTTTGTGATGAAGCTTT GGCTTTATGTAGTGATGAATGGTTTGCACAAGCAGGCTTTAGTGATAAAATTATGTGAAGCGCTC GAAAAAGATAAAGCCTCTATTTTTTTGTACAAGAAAAATGGGGAAAAACACTTTGGAGAGAAAAGAA CAATTACAGCAAGGTTT	A
1S22	AA1	AGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACAC TTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAACAGCT ATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGT TGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTGTGATTAACACCATACGCA CAGGCTGCAAACCTTACATCTTTTGGTCCCCTAACACCTCTGGTAACTCTGGTACTTCCGCAATATTC TCCATCCAATACTAGGATTAATAATAACCTCGGCTTGAATAAATCAGCTGAAACACCTTCTCCTAT TTCTGTAACAACACCTGCACCATCTGACCCTATTACTAACGGTAGATCCATTTCTTTTCTATTGTTTAT AATAAATAAATCCCTATGATTTAATCCTGCTGCTTTTAACTTTACTTTTACTTCCCAGCATTAGGATT TGTTTCAGATAAAAATTTATATTCTAACCCCTCTACCCCTTTTTTATATAGACAAAAT	B
1S22	AA5	TGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTGTGATTGGAATAAATTCGA TTTTGTCTATATAAAACGGGTATACACTTATTAATAACGTTATTACAAAACCATATACTAGTAAAAT CAACATAGAATGTAATGAATTGTCCACAGATCATGATGAATGTTTCCTTATGATGATTGCTCGTGATG AAAATTGGCAGCCTGTGCGTATATTGTTAAATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCAT GCGACGTCGG	G
10S21	B12	TCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTGTGATTATCAATATATGCACAGGCT GCAAATTTACATTGCGAACAAGCATACCAGAAAACGTTCTGCAAATGTTTCATAAAGCTTCTCGAC CTCTTCTGGGTGATTTCTTTATTGAAACGTTTCACAGTACCATTCACTTGTTTTTTCATAACTAAATC ACTCTTTGTCAAATGACATACGAGAAGATTGCGACAAAGTCCCAGCCGATTTACGGTAAAATGTA ACAGCAAATGGATGTAACATTGATACTGTATATCCGTCCTTTTTTCATCGTTTTGAAGAGAATGTTGAAG CAATCTTTCACATAACCGCTTCTTCTGTATTCTGGATACGTCGCTACCCCTGCAACGCCACCCATTTT AAATTTTCTTCTCTATGTAATATGAAACGGAATAAGGTGTAGTTTGCCGCTAAGTCCTCACCTT CCATAATACCGTATACTTCACTGACTTTCCTTCAATTTTGTAAAGTTGTTGCTGCATTCTTCTTCTAC TTTATATAGACAAAATTTGAATTTATCCAATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGC	C

10S21	B33	ACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATT CACTAGTGATTTATCACCATAATGCACAGGCTGCAAACTTTTCATCTTTTGGTCCCCCTAACACCTCTGG TAATTCTGGTACTTCGGCAATATTCTCCATCCAATACTAGGATTAATAAACCTCGGCTTGTAAATA AATCAGCTGAAACACCTTCTCCTATTCTGTAAACAATACCTGCACCATCTGACCAATTTACTTAACGGT AGATCCATTTCTTTTCTATTGTTTATAATAAAATAAAATCCCTATGATTTAATCTGCTGCTTTTAACTTT ACTTTTACTTCCCCGGCATTAGGATTTGTTTCAGATAAAAAATTATATTCTAACCCCTCTACCCCTTTT TTATATAGATAAAAAATCGAATTTATCCAATCGAATTCGCGCGGCCCATGGCGGCCGGGAGCATGC GACGTCGGGCCAATTCGCCCTA	B
1S22	BB9	CGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTTAACACCATACGCACAAGCTGCC AATTTTCATTTACAAGTGTTATTGTGCTTCTTATCGGTGCTTCTTCTACTCATGATGAATAATATT TGATGATTTTCGGATGTGTTGCACTACACTTTTCATTACGATCCATACATACTGAACGAGTAATAGAG CCTTCTTCTCAAAGATGATACTTTATTGGAAGGTTGGAAGCTCTTATTTCAAACCCCTTCTCTCCG TACTGTTACATGTATGGACTTAATTGAAACTTTTGCAGGGACGATATGGATCGGTGCTATTACGATG GCTTATGTAACAACCTGTCCTTCATAAAGGAGAAGAATGGTGGGGATTATTAATAACAAGTTATTATG TTGGGATGTAATAATTCGCGCCTGTGCGTATATTGATAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAG GTCGACCATATGGGAGAGCTCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGA	D
3S24	C13	ATTAAGAAGCAGCAAATTCATGATTTACAAGAAGAGTTTCCAAAACAGGATTAGAAGCAAATAAA AAAGTATATAATTATTGAGTACGCAGACCGTATGACGGCAAACGCAGCGAATACACTGTTGAAATTTT TAGAAGAACCAAGTAGTGATAACAACAGCTATTCTACTTACTGAACAAAGTCATAAAATTTAAATAC GATTTATCTCGCTGTCAAGTTGTTACATTTAGACGTTACCTACGGAATCTTAAATAGAAGATTAC AGGATGAAGGATTACGGCATCTTTACCAACACTTGTGTCACAACCTACGAATAGTTTGTGATGAAGC TTAGCTTTATGTAGTGATGAATGGTTTGCACAAGCAGAGCTTTAGTGATAAAAATATGTGAAGCG CTCGAAAAAGATAAAGCCTCTATTTTTTTGTACAAGAAAAATGGGGAAAAACACTTTAGAGAGAAA GAGCAATTACAGCAAGGTTAGATATGTTACTCCTTATTTATAAAGGATTTATTATATGTTCAACTTGG AGAAGAAGATCGTCTTGTTTTTCGTGAGCAGAAAGAGATGTTGAATCTTCTCCTACGCTCAGAAG CGCATTGTATCAGCTCTTTAATATATTAGAGGCCAAAAATAGAATCAACGCTAATGTAATTTG TGCTGTGCG	A
3S24	C16	ACAGGATGAAGGATTACGGCATCTTTATCAACACTTGTGTCACAACCTACGAATAGTTTGTGATGAA GCTTTGGCTTTATGTAGTGATGAATGGTTTGCACAAGCAGAGCTTTAGTGATAAAAATATGTGAAG CGCTCGAAAAAGATAAAGCCTCTATTTTTTTGTACAAGAAAAATGGGGAAAAACACTTTAGAGAGAA AGAGCAATTACAGCAAGGTTAGATATGTTACTCCTTATTTATAAGGATTTATTATATGTTCAACTG GAGAAGAAGATCGTCTTGTTTTTCGTGAGCAGAAAGAGATGTTGAATCTTCTCCTACGCTCAGAA GCGCATTGTATCAGCTCTTTAATATATTAGAGGCCAAAAATAGAATCAACGCTAATGTAATTTGG CAGCCTGTGCGTATACTGATAAATCAC	A
3S24	C4	GGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGATTTAACAGCATATGCA CAGGCAGCCAATTTCCATAAGCTTGTGGTATTCAAAAATCATTGTTAATTGCGCGGAACCAACTCC ACTTGGAGCGGTGTTACTCTCGAAAAATAAATCGGATCAATCGATTCACTACCATCTTCATTTTCGCA GATGTACTGTGTAACCGTTACTTCTGATTTTGTAGCAACCTTTTCTGCTGCTTGCATTGCCTTATCTG TCGTTGCATTAAAAAACCTTACTACCATTGTGTATAGTAAGGTGTAATGATCTTTTGAAGTTTTATCA TCATTTATATAGACAAAATCGAATTTATCCAATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGC ATGCGACG	E
8S21	CC1	AAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACT AGTGATTTAACAGTATACGCACAGGCAGCCAATTTACATCTTTTGGTCCCCCTAACACCTCTGGTAAC TCTGGTACTTCGGCAATATTCTCCATCCAATACTAGGATTAATAATAACCTCGGCTTGTAAATAATC AGCTGAAACACCTTCTCCTATTTCTGTAACAACACCTGCACCATCTGACCCTATTACTAACGGTAGAT CCATTTCTTTTCTATTGTTTATAATAAAATAAAATCCCTATGATTTAATCTGCTGCTTTTAACTTTACTTT TACTTCCCCGGCATTAGGATTTGTTTCAGATAAAAAATTATATTCTAACCCCTCTACCCCTTTTTTATA TAGATAAAAATTGAATTTATTCCAATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGT CGG	B
3S24	D10	GCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGATT TACCACTATACGCACAGGCAGCCAACCTTACATTGACTCTAAACTAGCTGTGCAATTTATCTACTTT TGCTGGTACTGTATATTCTTTACCTAAATATGTAATTTTTCGTTTTTTCGTTCTTTTTCGTTCTACTAGCC TTGTCTGTGGCTTTTTTCTCCTGAAGTTTATCTGCACTATTACATGCTGCTAGCTACACTTAA ACTGTAACCATCCCTAATGTAATAAATCTTATTATCTTTATATAGACAAAATTTGAATTTATCCA ATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCG	F

* Genes con mayor similitud a la secuencia consenso. A: Unidad sigma de ADN Polimerasa III de varias especies del género *Bacillus*. B: Alcohol Deshidrogenasa asociada a zinc de varias especies del género *Bacillus*. C: Acetil transferasa de *B. cereus* y *B. thuringiensis*. D: Permeasa de *B. cereus*. E: secuencia del plásmido pALH1 d *B. thuringiensis* Al Hakam. F: Compuesto asociados a hierro de *B. cereus* y *B. thuringiensis*. G: Adenina desaminasa de *B. cereus*.

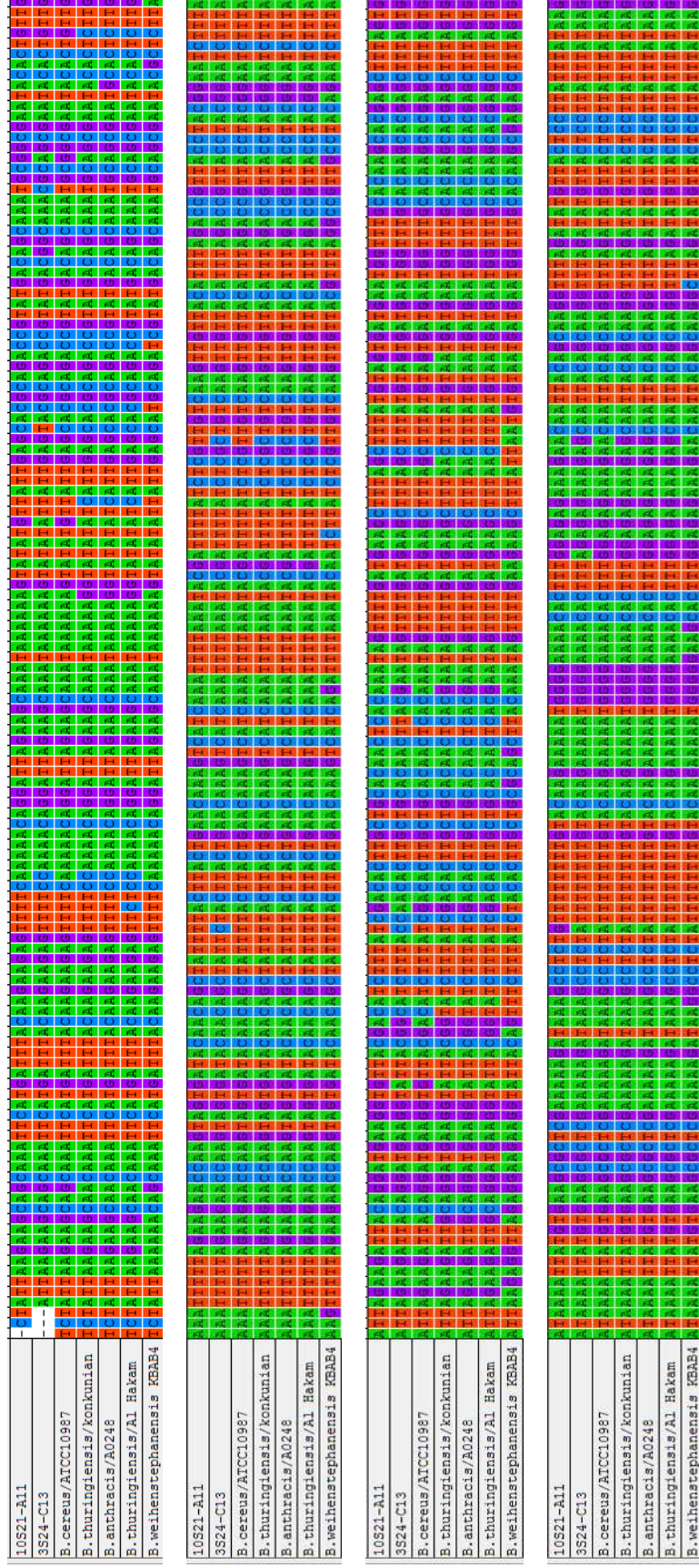
Cuadro 12. BLASTS correspondientes de cada fragmento secuenciado obtenido de las distintas cepas presuntivas de *B. thuringiensis* aisladas. Se presentan las 1-5 secuencias con las que más similitud se encontró.

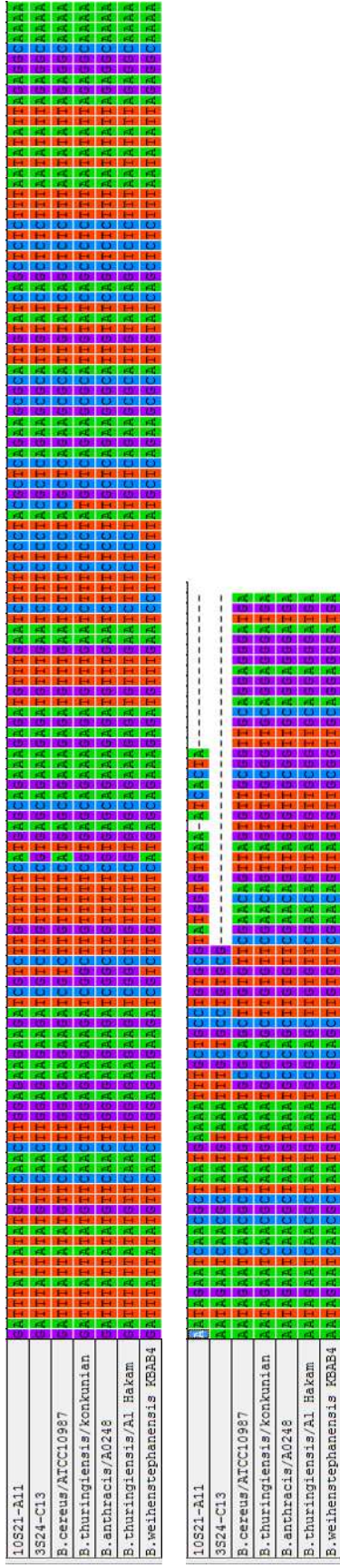
Cepa y fragmento	# de acceso	Descripción	Amplitud de Búsqueda	Valor-E	Identificación máxima
10S21 - A11	AE017194.1	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	95%	0	99%
	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	95%	0	99%
	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	95%	0	97%
	CP001283.1	Bacillus cereus AH820, complete genome	95%	0	97%
	CP000001.1	Bacillus cereus E33L, complete genome	95%	0	97%
10S21-A17	AE017194.1	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	100%	0	99%
	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	100%	0	98%
	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	100%	0	96%
	CP001283.1	Bacillus cereus AH820, complete genome	99%	0	96%
	CP001407.1	Bacillus cereus 03BB102, complete genome	99%	0	96%
1S22-A11	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	88%	6.00E-161	99%
	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	88%	6.00E-161	99%
	CP000001.1	Bacillus cereus E33L, complete genome	88%	3.00E-149	97%
	CP001598.1	Bacillus anthracis str. A0248, complete genome	88%	1.00E-147	96%
	CP001215.1	Bacillus anthracis str. CDC 684, complete genome	88%	1.00E-147	96%
1S22-AA5	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	52%	1.00E-62	97%
	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	52%	1.00E-62	97%
	AE016877.1	Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome	52%	7.00E-50	91%
	CP001407.1	Bacillus cereus 03BB102, complete genome	48%	3.00E-48	93%
	CP001283.1	Bacillus cereus AH820, complete genome	48%	3.00E-48	93%
10S21-B12	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	95%	0	96%
	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	95%	0	96%
	CP001407.1	Bacillus cereus 03BB102, complete genome	95%	0	94%
	CP000485.1	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome	95%	0	94%
	CP000001.1	Bacillus cereus E33L, complete genome	95%	0	94%

10S21-B36	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	97%	7.00E-155	98%
	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	97%	7.00E-155	98%
	CP000001.1	Bacillus cereus E33L, complete genome	97%	2.00E-146	97%
	CP001598.1	Bacillus anthracis str. A0248, complete genome	97%	7.00E-145	96%
	CP001215.1	Bacillus anthracis str. CDC 684, complete genome	97%	7.00E-145	96%
	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	98%	8.00E-180	97%
1S22-BB9	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	98%	8.00E-180	97%
	AE017194.1	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	94%	3.00E-174	98%
	CP000001.1	Bacillus cereus E33L, complete genome	97%	8.00E-155	94%
	CP001283.1	Bacillus cereus AH820, complete genome	93%	2.00E-141	92%
	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	97%	0	99%
	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	97%	0	98%
3S24-C13	CP000001.1	Bacillus cereus E33L, complete genome	97%	0	97%
	AE017194.1	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	97%	0	97%
	AE017355.1	Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome	97%	0	97%
	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	95%	0	98%
	AE017194.1	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	95%	0	97%
	CP001598.1	Bacillus anthracis str. A0248, complete genome	95%	0	97%
3S24-C16	CP001215.1	Bacillus anthracis str. CDC 684, complete genome	95%	0	97%
	CP001407.1	Bacillus cereus 038B102, complete genome	95%	0	97%
	CP000486.1	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, plasmid pALH1	96%	5.00E-111	94%
	CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	99%	2.00E-155	100%
	CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	99%	2.00E-155	100%
	CP000001.1	Bacillus cereus E33L, complete genome	99%	9.00E-144	97%
8S21-CC1	CP001598.1	Bacillus anthracis str. A0248, complete genome	99%	4.00E-142	97%
	CP001215.1	Bacillus anthracis str. CDC 684, complete genome	99%	4.00E-142	97%
	CP000001.1	Bacillus cereus E33L, complete genome	99%	4.00E-101	97%
	AE017194.1	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	99%	4.00E-101	97%

CP001407.1	Bacillus cereus O3BB102, complete genome	99%	2.00E-99	96%
CP000227.1	Bacillus cereus Q1, complete genome	99%	2.00E-99	96%
CP001177.1	Bacillus cereus AH187, complete genome	99%	2.00E-99	96%
CP000485.1	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome	99%	2.00E-99	96%

1) Alineación de secuencias para análisis filogenético utilizando una porción del gen de una subunidad de la ADN polimerasa III:





2. Alineación de secuencias para análisis filogenético utilizando una porción del gen de la alcohol deshidrogenasa:

