

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de la biodiversidad de cepas presuntivas de *Bacillus thuringiensis* en distintos nichos de la filoesfera del árbol del aguacate en Guatemala, Sacatepéquez y Alta Verapaz, 2008

Trabajo de tesis presentado por Dinora Roche Recinos para optar al título de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2008

Caracterización de la biodiversidad de cepas presuntivas de *Bacillus thuringiensis* en distintos nichos de la filoesfera del árbol del aguacate en Guatemala, Sacatepéquez y Alta Verapaz, 2008

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Caracterización de la biodiversidad de cepas presuntivas de *Bacillus thuringiensis* en distintos nichos de la filoesfera del árbol del aguacate en Guatemala, Sacatepéquez y Alta Verapaz, 2008

Trabajo de tesis presentado por Dinora Roche Recinos Para optar al título de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2008

Vo.Bo.:

(f) _____
Licda. Maricruz Álvarez Mury
Asesora de Tesis

Tribunal Examinador:

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

(f) _____
Licda. Maricruz Álvarez Mury
Asesora de Tesis

(f) _____
Licda. María Beatriz López

Fecha de Aprobación: Guatemala 17 de junio 2008

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la oportunidad de llegar hasta donde llegué, y a mi familia por estar siempre ahí, a la Goya por esperarme hasta las 3 de la tarde cuando tenía que trabajar y por levantarse temprano aunque no tenía que hacerlo, gracias por su apoyo. A mi mamá y a mi papá por siempre estar ahí empujando la carreta por mí... a la Andrea (nítido... tu palabrita de moda...) por apoyarme y ayudarme con la redacción.

Quisiera agradecer a mi asesora la Lda. Maricruz Álvarez Mury por haberme dado la información inicial para conseguir este trabajo que luego se transformó en mi tesis, por mantener la cordura cuando se dieron momentos de estrés, sus buenos consejos y por su amistad.

A la Lda. María Beatriz López, por haberme dejado trabajar en su laboratorio y prestarme su equipo, por su ayuda en los momentos difíciles y por su amistad.

A la Lda. Claudia Silvana Umaña y a la Lda. Renata Mendizábal de Cabrera, gracias a ambas por haber respondido mis dudas, por haberme dado la luz en momentos de incertidumbre y por guiar mis geles a buen puerto. Porque no era su obligación ni estaban trabajando en mi proyecto y me tendieron siempre la mano, y dieron solución a mis problemas.

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	35
V.	JUSTIFICACIÓN	36
VI.	MÉTODOS	37
VII.	RESULTADOS	60
VIII.	DISCUSIÓN	79
IX.	CONCLUSIONES	85
X.	RECOMENDACIONES	86
XI.	BIBLIOGRAFÍA	87
XII.	ANEXOS	94

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Fragmentos NotI en el cromosoma de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> H2D	6
2. Composición de aminoácidos y carbohidratos de la proendotoxina de <i>B. thuringiensis</i> y sus componentes de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	13
3. Vida media de la ADN <i>Taq</i> Polimerasa a temperaturas elevadas	23
4. Distribución de la producción nacional de aguacate, a nivel de departamento	32
5. Fincas y producción de aguacate, de los principales municipios productores del departamento de San Marcos. Año agrícola 2002/2003	33
6. Orden y reactivos para PCR.	48
7. Programa para PCR de 16S ADNr	49
8. Fotos de colonias con frote de Gram y azul de Coomassie primer muestreo.	61
9. Resultados obtenidos con la tinción de azul de Coomassie del primer muestreo.	62
10. Fotos de colonias con frote de Gram y azul de Coomassie del segundo muestreo	63
11. Resultados obtenidos con la tinción de azul de Coomassie del segundo muestreo	64
12. Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de suelo del primer muestro en la región 16S del ADN ribosomal	66
13. Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de hojarasca del primer muestro en la región 16S del ADN ribosomal	67
14. Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de follaje del primer muestro en la región 16S del ADN ribosomal	68
15. Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de suelo del segundo muestro en la región 16S del ADN ribosomal	69
16. Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de hojarasca del segundo muestro en la región 16S del ADN ribosomal	69
17. Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de follaje del segundo muestro en la región 16S del ADN ribosomal	70
18. Aislamientos diferentes de los dos controles utilizados encontrados luego del análisis por medio de SSCP para muestras del primer muestreo	71
19. Aislamientos diferentes de los dos controles utilizados encontrados luego del análisis por medio de SSCP para muestras del segundo muestreo	72
20. Proporción binomial al primer muestreo	73
21. Proporción binomial al segundo muestreo	73
22. Análisis de variantes genéticas por medio del índice de Simpson de muestras de suelo del primer muestreo	74
23. Análisis de variantes genéticas por medio del índice de Simpson de muestras de hojarasca del primer muestreo	74
24. Análisis de variantes genéticas por medio del índice de Simpson de muestras de follaje del primer muestreo	75
25. Análisis de variantes genéticas por medio del índice de Simpson de muestras de suelo del segundo muestreo	75
26. Análisis de variantes genéticas por medio del índice de Simpson de muestras de hojarasca del segundo muestreo	76
27. Análisis de variantes genéticas por medio del índice de Simpson de muestras de follaje del segundo muestreo	77
28. Índice de Diversidad de Simpson para todas las muestras	77

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Micrografía electrónica de Bt2-56	4
2. Micrografía de transmisión electrónica de una célula de <i>B. thuringiensis</i> (Bt) esporulando	5
3. Mapa físico del cromosoma de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> H2D basado en fragmentos de NotI	6
4. Mapas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> HD2, <i>B. cereus</i> ATCC 14579	7
5. Estructura primaria y terciaria de las toxinas <i>cry</i>	10
6. Estructura tridimensional de <i>cry1A</i> , <i>cry13A</i> y <i>cyt2A</i>	11
7. Modo de acción de las toxinas <i>cry</i>	12
8. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS del cristal parasporal de <i>B. thuringiensis</i>	14
9. Membrana de borde de cepillo continua caracteriza el epitelio de la sección intermedia del sistema digestivo de larvas control de <i>Simulium pertinax</i>	18
10. Célula columnar de la sección media del sistema digestivo de una larva luego de tratamiento por 3 h con suspensión 2 mg/L de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> (Bti)	19
11. Molécula de azul de Coomassie G-250	21
12. Crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> , cepa control 6112, en agar cromogénico OXOID modificado.	42
13. Tinción de azul de Coomassie de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> . 1000x. Microscopia parascopal	43
14. Tinción Gram positivo de Aislado no identificado 1000x. Microscopia parascopal	44
15. Verificación de la ampliación de los productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores o primers 50F y 222R, utilizando el control de Dipel® y la cepa control 6112 de <i>B. thuringiensis</i>	50
16. Visualización de las mutaciones puntuales de la región 16S del ADN ribosomal de <i>B. thuringiensis</i> , luego de la optimización del protocolo de la técnica de SSCP	65

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positivo, espora formadora y móvil. Ha sido aislada de suelo, graneros y productos almacenados. Se caracteriza por la producción durante la esporulación de inclusiones paraesporales cristalinas que contienen proteínas insecticidas. El espectro de actividad de estas proteínas incluye al menos tres órdenes, Lepidóptera, Coleóptera y Díptera así como nemátodos. El objetivo principal del estudio consistió en comprobar la existencia de cepas nativas guatemaltecas de *B. thuringiensis* en la filoesfera del árbol de aguacate variedad Hass. Los específicos incluyeron su caracterización morfológica, su caracterización molecular a partir de mutaciones puntuales en la región 16S del ADN ribosomal además de correlacionar la variabilidad de cepas con el nicho y el área ecogeográfica. El estudio se dividió en dos fases, el aislamiento de *B. thuringiensis* de: hojarasca, follaje y suelo de árboles de aguacate Hass provenientes de dos fincas ubicadas en dos regiones de Guatemala. La segunda fase consistió en la extracción del ADN de los aislados y el análisis por medio de SSCP para la detección de sus mutaciones puntuales; además del análisis estadístico de las variantes genéticas por medio del índice de Simpson. La única prueba para la confirmación de *B. thuringiensis* utilizada, fue la tinción de cristales con azul de Coomassie de acuerdo a la definición de *B. thuringiensis* dada en el estudio. Se encontraron 171 aislados positivos de 296 aislados. Luego del análisis con SSCP y uso el índice de Simpson, se encontró que en el suelo de la región de Alta Verapaz, existe la mayor cantidad de cepas mutantes, y se puede inferir que dentro de éstas se podrían encontrar las cepas nativas.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a Gram positive, spore forming and mobile bacteria. It has been isolated from soil, barns and almacenated products. It is characterized by the formation during sporulation of crystal paraspore inclusions that contain insecticide proteins. The activity spectrums of these proteins include at least three orders, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera and nematods. The principal objective of this study was to prove the existence of native Guatemalan strains of *B. thuringiensis* in the phylosphere of the Hass variety avocado tree. The specific objectives included the morphological characterization and the molecular characterization of the punctual mutations of the 16S region of the ribosomal DNA in addition to the correlation of the variability of the strains with the niche and the ecogeographic area. The study was divided in two phases, the isolation of *B. thuringiensis* of: soil, leaves and verbiage of Hass avocado trees from two estates located in two regions of Guatemala. The second phase consisted on the extraction of the DNA of the isolates and the analysis by means of the SSCP technique for the detection of the punctual mutations; besides the statistical analysis of the genetic variants by means of the Simpson index. The only proof for the confirmation of *B. thuringiensis* used was the Coomassie blue stain for crystals, according to the definition of *B. thuringiensis* given in the study. 171 positive isolates were found out of 296 isolates. After the SSCP analysis and the use of the Simpson index it was found that the greatest amount of mutant stocks exists in the soil sample of Alta Verapaz, and it is possible to be inferred that within these stocks the native strains could be found.

I. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país netamente agrícola y el aguacate constituye uno de sus principales cultivos de exportación. Con el objetivo de obtener una alternativa natural viable para el manejo de las plagas del aguacate, se pretende aislar mediante cultivo en medio selectivo, cepas nativas de Guatemala de *B. thuringiensis* de la filoesfera del árbol de aguacate, suelo, hojarasca y follaje.

Para este estudio se realizaron dos muestreos cada uno en una región diferente, el primer muestro se realizó en el departamento de Sacatepéquez el cual posee 2,351 fincas de aguacate y produce 52,411 quintales y el segundo muestreo se realizó en el departamento de Alta Verapaz el cual posee 7,501 fincas de aguacate y produce 40,694 quintales. El departamento de Sacatepéquez al igual que el departamento de Chimaltenango son zonas eminentemente agrícolas en ambas el cultivo de productos agrícolas tradicionales tales como las hortalizas determina un renglón importante de la economía de ambos departamentos y por ello el uso de insecticidas tanto químicos como bioinsecticidas constituyen una práctica común.

Se establecerá un protocolo adecuado para el aislamiento de la bacteria a partir de las tres diferentes clases de muestras. Una vez aislada la bacteria y caracterizada morfológicamente, se llevará a cabo una caracterización genética de las cepas productoras de cristales por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la región 16S del ADN ribosomal, y el polimorfismo conformacional de hebra única (SSCP), técnica por medio de la cual se detectan mutaciones puntuales.

Se estudiará la región 16S del ADN ribosomal, escogida por permitir la diferenciación entre serotipos. Debido a que se quiere diferenciar entre cepas y determinar la variabilidad de *B. thuringiensis* asociadas a diferentes nichos y condiciones ecogeográficas del aguacate.

II. HIPÓTESIS

Existen presuntas cepas nativas guatemaltecas de *Bacillus thuringiensis* en la filoesfera del árbol de aguacate Hass que difieren microscópica y genéticamente en la región 16S del ADN ribosomal.

La biodiversidad de las presuntas cepas nativas guatemaltecas de *Bacillus thuringiensis* en la filoesfera del árbol de aguacate Hass varía según la región ecogeográfica de donde provienen.

III. ANTECEDENTES

A. Historia

Bacillus thuringiensis fue inicialmente aislada a partir de una larva de gusano de seda enferma en 1901 en Japón por el bacteriólogo, Ishawata, y fue investigada en 1911 por el bacteriólogo Ernst Berliner en Alemania, cuando un lote de polillas de harina que estaba infectado con este patógeno, fue enviado del pueblo de Thuringia en Alemania. Fue utilizado como un insecticida comercial por primera vez (bajo el nombre comercial de Sporeine) en el año 1938 en Francia, y luego en los Estados Unidos en la década de los cincuentas (Chattopadhyay, 2004).

Esta bacteria tiene más de 58 serotipos (variedades o subespecies) y miles de cepas aisladas. Esta clasificación de cepas en variedades o subespecies está basada en los antígenos flagelares. Todas estas subespecies son efectivas en contra de un vasto espectro de insectos y también nemátodos. Cada cepa produce una toxina única que es efectiva en contra de un grupo específico de insectos; las proteínas cristalinas que también difieren en su grado de actividad en contra de diferentes órdenes de insectos. A la fecha cerca de 150 insectos son conocidos por su susceptibilidad a *B. thuringiensis* (Chattopadhyay, 2004).

B. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positivo, espora formadora y móvil gracias a sus flagelos peritricos (ver Figura 1) (Ghelardi *et al.*, 2002). Sus células vegetativas miden aproximadamente 1 μm de ancho por 5 de largo (Chattopadhyay, 2004).



Figura 1: Micrografía electrónica de Bt2-56. Micrografía transmisión electrónica de esporas teñidas negativamente de Bt2-56 conteniendo: (a) filamento, (b) estructura con forma de saco que contiene una espora y (c) un cuerpo paraesporal (Rampersad, 2005).

El ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis* está dividido en dos fases, el crecimiento vegetativo y la esporulación. Durante la primera fase, cuando la bacteria está en un ambiente rico en nutrientes el crecimiento es exponencial. Cuando los nutrientes escasean, la bacteria esporula, formando esporas que permanecen viables en el ambiente por largos periodos de tiempo hasta que las condiciones favorables para el crecimiento vegetativo retornan. Los hábitats a partir de los cuales las subespecies de *B. thuringiensis* han sido aisladas son diferentes, tales como: suelo (que se cree es su hábitat preferido), graneros y productos almacenados (Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995).

Durante la esporulación este organismo produce una variedad de δ -entotoxinas (proteínas *cry*, cristal delta endotoxinas o cristales de endotoxinas delta) que son primariamente responsables de su actividad insecticida altamente específica (ver Figura 2) (Ghelardi *et al.*, 2002 y Nicholls *et al.*, 1989); y las toxinas *cyt* que han sido agrupadas en dos clases. Las inclusiones paraesporales contienen muchas proteínas, que algunas veces poseen distintas actividades y pueden actuar de manera sinérgica. Adicional a las toxinas *cry* y *cyt*, *B. thuringiensis* posee un cierto número de factores de virulencia incluyendo α -exotoxinas, beta-exotoxinas, quitinasas, proteína insecticida vegetativa (Vip), flagelina, enterotoxinas, hemolisinas y fosfolipasas (Chattopadhyay, 2004).

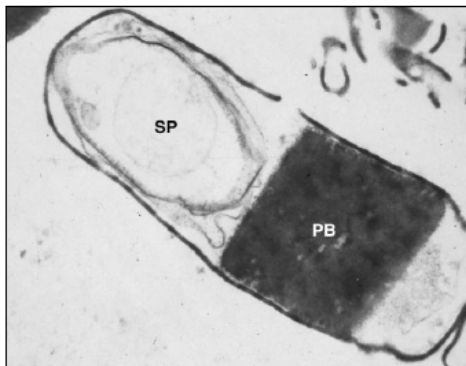


Figura 2: Micrografía de transmisión electrónica de una célula de *B. thuringiensis* (Bt) esporulando. La δ -endotoxina es producida como cristales con formas regulares (PB; cuerpo proteínico) de ahí viene el nombre (*cry*) cristales proteínicos, junto a la espora (SP). La pared celular vegetativa eventualmente se romperá para liberar la espora y el cristal. La célula mostrada tiene aproximadamente 2 μm de largo (Maagd, 2001).

B. thuringiensis presenta además una metaloproteasa toxina neutral inhibidora inmune A (InA) que ha mostrado degradar específicamente proteínas bacterianas de *Hyalophora cecropia* (polilla de seda) y también ha demostrado ser tóxica a otras especies de insectos y las proteínas de cubierta de la bacteria también contribuyen a la patogenicidad de *B. thuringiensis* (Chattopadhyay, 2004).

1. Morfología de la colonia de *B. thuringiensis*. Los aislados de *B. thuringiensis*, de agar nutritivo e incubadas a $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ tienen colonias con morfología: circular, blancas, planas, onduladas o enteras (Chatterjee *et al.*, 2007).

2. Genoma de *B. thuringiensis*. Las cepas de *B. thuringiensis* tienen un genoma de 2.4-5.7 millones de pares de bases (pb). Estos mapas físicos han sido construidos para dos cepas de *B. thuringiensis* (ver cuadro 1 y Figura 3). Los genomas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* fueron 22-33% mayores que el genoma de *B. subtilis* el cual tiene un tamaño de 4.2 Mb (Carlson, 1993).

Cuadro 1: Fragmentos NotI en el cromosoma de *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* H2D (Carlson, 1993).

Fragmento	Tamaño (kb)
A	1,350
B	750
C	680
D	450
E	350
F	340
G	300
H	260
I	200
J	200
K	170
L	130
M	110
N	60
O	60
P	15
Total (sin bandas extracromosomales).....	5,425

Una comparación con el mapa cromosomal de *B. cereus* sugiere que todos estos cromosomas tienen una organización similar en la mitad cercana al origen de replicación, mientras que muestra una mayor variabilidad en la mitad Terminal (Schnepf *et al.*, 1998).

Se ha encontrado que, incluso bajo condiciones astringentes, sondas de *B. cereus* se han hibridizado a fragmentos de *B. thuringiensis*. La cercanía entre *B. thuringiensis* y *B. cereus* se confirman en estos resultados (ver Figura 4).

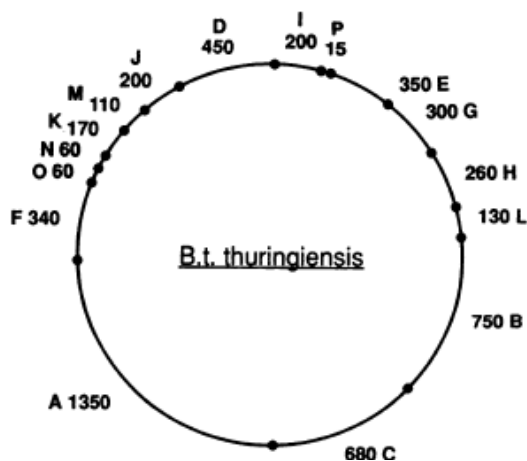


Figura 3: Mapa físico del cromosoma de *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* H2D basado en fragmentos de NotI (Carlson, 1993).

El hecho que algunas cepas de *B. thuringiensis* produzcan enterotoxinas del tipo *B. cereus* sugieren que estas cepas pueden ser consideradas como cepas productoras de enterotoxinas que han adquirido plásmidos que contienen el gen *cry* (Carlson, 1993).

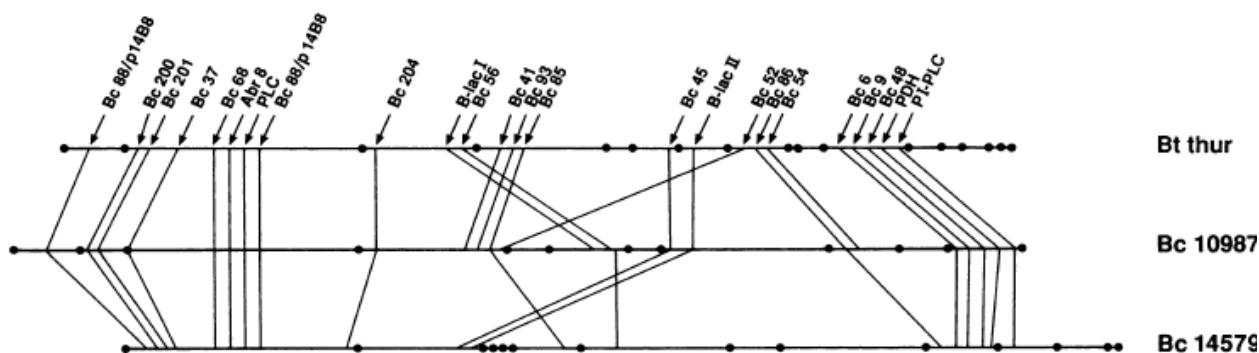


Figura 4: Mapas de *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD2, *B. cereus* ATCC 14579 fueron alineados para obtener la máxima similitud aparente. Sondas que reaccionaron con dos o tres cepas fueron marcadas por líneas (Carlson, 1993).

B. thuringiensis posee elementos extracromosomales, algunos de ellos circulares y otros lineales. Se ha reconocido que las proteínas que comprenden el cristal parasporal están generalmente codificadas por grandes plásmidos. Secuencias hibridantes a sondas para los genes *cry* ocurren comúnmente en los cromosomas de *B. thuringiensis*, aunque no está claro hasta que grado la homología cromosomal contribuye a la producción del cristal (Schnepf *et al.*, 1998).

a. Región 16S del ácido desoxiribonucleico ribosomal (ADNr). La síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas, partículas ribonucleoproteicas (cerca de dos tercios de ARN y un tercio de proteína) y consisten de subunidades grandes y pequeñas. En las eubacterias el ribosoma 70S está constituido de las subunidades 30S y 50S. La subunidad 30S consiste de ARN ribosomal 16S y 21 proteínas; la subunidad 50S consiste de la 23S y el ARNr 5S y 34 proteínas (Berg *et al.*, 2002).

Las secuencias de ADN que codifican al ARNr normalmente se repiten cientos de veces. Este ADN, llamado ADNr, de ordinario se agrupa en una o unas pocas regiones del genoma. Estas regiones que contienen el ADNr se denominan organizadores nucleolares (Karp, 1998).

Para determinar las relaciones filogenéticas que cubren el espectro entero de sistemas vivientes, se necesita de una molécula que tenga una distribución amplia. Ninguna de las proteínas que ya han sido caracterizadas con anterioridad cabe en esta descripción. Sin embargo, el ARN ribosomal sí lo hace. Es un componente de todos los sistemas auto-replicantes; es

fácilmente aislable y su secuencia cambia lentamente en el tiempo, permitiendo la detección de relaciones evolutivas entre especies distantes. A la fecha, la estructura primaria del ARN ribosomal 16S para procariotas (18S para eucariotas) ha sido caracterizado en varias colecciones de organismos y organelos. La estructura filogenética general para el dominio procariota esta empezando a emerger (Woese, 1977)

b. Elementos transposables en *B. thuringiensis*. Las especies de *B. thuringiensis* almacenan una gran variedad de elementos transposables, incluyendo secuencias de inserción y transposones (Schnepf *et al.*, 1998).

La organización del ambiente del gen *cry1A* mostró que los genes de este tipo están flanqueados por dos juegos de secuencias repetidas invertidas. El análisis de la secuencias de nucleótidos revelaron que estos elementos repetitivos eran secuencias de inserción que han sido designadas IS231 y IS232. IS231 pertenecen a la familia de secuencias de inserción IS4, y IS232 pertenece a la familia IS21. Debido a que estos elementos se pueden transposar, es probable que estos provean de movilidad a los genes *Cry* con los cuales forman típicos transposones (Schnepf *et al.*, 1998).

c. Expresión de los genes *Cry*. Una característica común de los genes *cry* es su expresión durante la fase estacionaria. Sus productos generalmente se acumulan en un compartimiento de la célula madre para formar la inclusión cristalina que da parte del 20-30% del peso seco de las células esporuladas. El alto nivel de síntesis de proteínas cristalinas en *B. thuringiensis* y su coordinación con la fase estacionaria son controladas por una variedad de mecanismos que ocurren a nivel transcripcional, postranscripcional y en niveles post-traduccionales (Schnepf *et al.*, 1998).

1) Número de copias del gen *Cry*. El nivel de expresión de un gen puede estar influenciado por su número de copias y la amplificación de genes ha sido utilizada frecuentemente para sobre producir proteínas de interés industrial. Los genes *cry* están localizados en plásmidos, muchas cepas de *B. thuringiensis* llevan diferentes genes *cry*. Esta amplificación natural de los genes *cry* puede por lo tanto contribuir a la alta producción de toxinas en las diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Sin embargo, las cepas de *B. thuringiensis* que llevan un solo gen *cryI* (ej., subsp. *kurstaki* HD73) sintetizan cristales bipiramidales que no son

significativamente más pequeños que aquellos producidos por cepas que llevan tres o cuatro genes *cryI* (ej., *kurstaki* HD1 o subsp. *aizawai* 7.29) (Agaisse, 1995).

Si se asume que el número de copias de los plásmidos grandes que llevan los genes *cry* son similares en estas cepas de *B. thuringiensis*, pareciera entonces que la producción de toxinas en *B. thuringiensis* no es estrictamente proporcional al número de copias de los genes *cry*. Esto sugiere que la capacidad de las cepas de *B. thuringiensis* de producir cristales proteicos es limitada o controlada (aunque en un alto nivel) y llega a un máximo en un cierto número de copias del gen *cry* en la célula, arriba del cual no existe un aumento en la síntesis (Agaisse, 1995).

La velocidad de degradación del ARNm tiene consecuencias sustanciales en la expresión de los genes. Un elemento importante en maximizar la expresión de genes es la producción de ARNm estable. Se espera obviamente que las proteínas altamente expresadas sean codificadas por ARNm estable. Por lo tanto, es probable que los altos niveles de producción de δ -endotoxinas sean debidos en parte a que su ARNm es estable (Agaisse, 1995).

Se ha demostrado que los ARNm que codifican para la proteína cristalina están dentro de los ARNm de larga vida presentes en *B. thuringiensis* durante la fase estacionaria y tiene una vida media promedio de 10 min. Los determinantes de la estabilidad del ARNm son elementos *cis* que actúan como estabilizadores del ARNm. Son parte de regiones no traducidas y están clasificados en dos grupos. De acuerdo a su localización en el ARNm: (i) estructuras 3' terminales y (ii) estabilizadores 5' de ARNm. Estos dos tipos de determinantes han sido encontrados en el ARNm de los genes *cry* (Agaisse, 1995 y Schnepf *et al.*, 1998).

2) Toxinas *Cry* de *B. thuringiensis*. Los cristales de toxinas son clasificados con base a su secuencia homóloga de aminoácidos, donde cada protoxina adquiere un nombre consistiendo del nemónico *cry* (o *cyt*) y cuatro rangos jerárquicos consistiendo de números, letras mayúsculas, letras minúsculas y números (por ejemplo *cry25Aa1*), dependiendo de su lugar en el árbol filogenético. Las proteínas con menos del 45% de identidad de la secuencia difieren de rango primario (*cry1*, *cry 2*, etc.), y el 78% y 95% de identidad constituyen la frontera para los rangos secundarios y terciarios respectivamente (Maagd, 2001).

El alineamiento de las toxinas *cry* revela la presencia de cinco bloques de secuencia conservados comunes a la gran mayoría de las proteínas. La Figura 5, muestra la presencia o

ausencia de cada uno de estos bloques en los subgrupos de las familias de toxinas. También se nota la diversidad en el largo entre los diferentes grupos de protoxinas; en particular un gran grupo que es aproximadamente el doble de largo que el resto. La extensión en el extremo C-terminal encontrada en las protoxinas más largas no es parte activa de la proteína (es digerida por proteasas en el intestino del insecto), pero se cree que tienen un papel en la formación del cristal (Maagd, 2001).

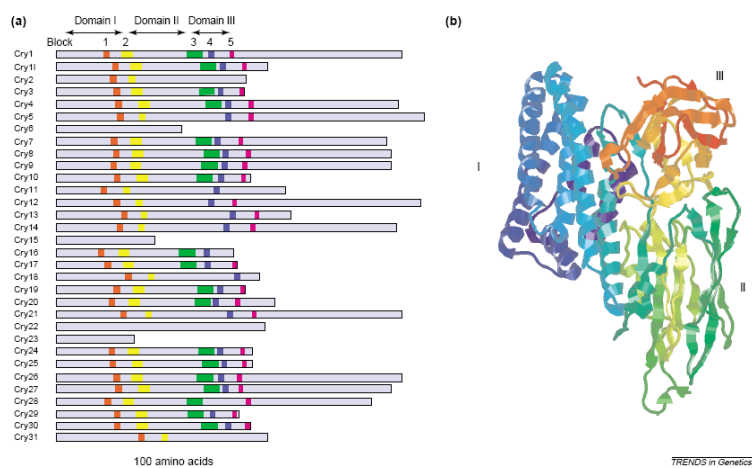


Figura 5: Estructura primaria y terciaria de las toxinas *cry*. (a) largos relativos de las protoxinas *cry* y la posición de cinco bloques conservados, si están presentes. Las posiciones de los tres dominios de las toxinas activadas están indicadas para *cry1* y varían con las posiciones de los bloques dos y tres para las otras toxinas. El remanente de la protoxina, consistente de una corta parte N-terminal (20-40 aminoácidos) procedentes del primer dominio y la parte C-terminal siguiendo el tercer dominio en las protoxinas más largas, es digerido por medio de proteasas intestinales durante el proceso de activación. (b) Estructura tridimensional de una toxina activada, *cry1Aa*. La toxina tiene tres dominios estructurales. Dominio I (azul) está involucrado en la inserción en la membrana y en la formación del poro. Dominio II (verde) y dominio III (amarillo-rojo) están involucrados en el reconocimiento y unión a receptores. El bloque conservado uno es la hélice central del dominio I, el bloque dos está en la interfase del dominio I-II, bloque tres está en la frontera entre los dominios II y III, bloque 4 está en la hebra β central del dominio III y el bloque cinco está hacia el final del dominio III (Maagd, 2001).

Las estructuras tridimensionales de las tres formas activas de toxinas de *B. thuringiensis*, *cry1*, *cry2* y *cry3*, son marcadamente similares, cada una consistiendo de 3 dominios (ver Figura 6) (Maagd, 2001).

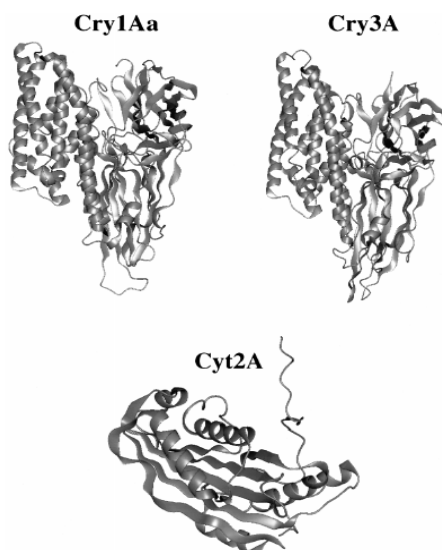


Figura 6: Estructura tridimensional de *cry1A*, *cry13A* y *cyt2A* (Schnepf *et al.*, 1998).

Ahora bien, dependiendo de la composición de la protoxina, los cristales tienen varias formas: bipiramidal (*cry1*), cuboidal (*cry2*), rectangular plano (*cry3A*), irregular (*cry3B*), esférico (*cry4A* y *cry4B*) y romboide (*cry11A*). Esta habilidad de las protoxinas de cristalizarse puede disminuir su susceptibilidad a la degradación proteolítica (Schnepf *et al.*, 1998).

Sin embargo, los cristales deben ser solubilizados rápida y eficientemente en el sistema digestivo de las larvas de los insectos sensibles para convertirse en biológicamente activos. La estructura y la solubilidad características de un cristal dependen presumiblemente de factores tales como la estructura secundaria de la protoxina, la energía de los enlaces de disulfuro y la presencia de componentes adicionales específicos de *B. thuringiensis* (Schnepf *et al.*, 1998).

a) Modo de acción y relación de estructura-función. La toxina ejerce su efecto patológico al formar poros líticos en la membrana de las células epiteliales de la sección intermedia del sistema digestivo del insecto de acuerdo al mecanismo propuesto en la Figura 7 (Maagd, 2001).

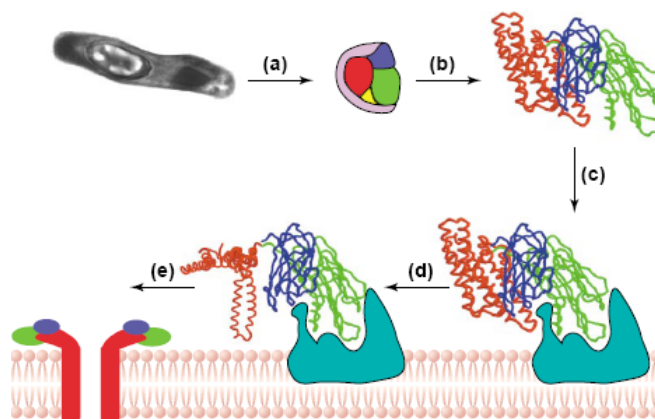


Figura 7: Modo de acción de las toxinas *cry*. (a) luego de la ingestión por el insecto, los cristales se disuelven en los jugos intestinales. (b) las proteasas intestinales subsecuentemente cortan las extensiones de los extremos C-terminales en las proteínas *cry* más largas (morado) así como los fragmentos N-terminales (amarillo). (c) la toxina “activada” resultante (i.e., la estructura mostrada en la Figura anterior) se une a los receptores en las membranas de las células epiteliales, un proceso en el que ambos dominios II y III están involucrados. (d) un rearrreglo estructural del dominio I puede seguir permitiendo que la hélice de ganchillo que se inserte en la membrana. (e) las toxinas insertadas forman poros probablemente como oligómeros pero la arquitectura de este poro es todavía desconocida (Maagd, 2001).

Cada paso de este mecanismo puede modular la actividad en contra de un insecto particular y por lo tanto la especificidad total de una toxina. La solubilización de las protoxinas (i.e., la proteína como aparece en cristales, antes de la activación por proteasas intestinales) con extremo C-terminal extendido depende del alto pH alcalino del intestino de Lepidóptera y Díptera (Maagd, 2001 y Nicholls *et al.*, 1989).

Algunas de las toxinas con potencial actividad contra Coleóptera son tóxicas después de la solubilización *in vitro*, probablemente debido a que la protoxina es insoluble en el intestino de pH neutro a casi ácido de Coleóptera. Diferencias en la actividad proteolítica entre los insectos blanco pueden llevar a cambios en la especificidad. Nuevamente, grandes diferencias en la fisiología intestinal entre los diferentes ordenes de insectos pueden tener un papel importante en este aspecto: las principales proteasas digestivas de Lepidóptera y Díptera son proteasas de serina, mientras que en Coleóptera son principalmente proteasas aspárticas y de cisteína (Maagd, 2001 y Nicholls *et al.*, 1989).

3. Composición del cristal parasporal de *Bacillus thuringiensis*. El cristal parasporal de *B. thuringiensis* está compuesto de aproximadamente 95% de proteína y 5% de carbohidrato. Las composiciones de ambos se observan a continuación en el cuadro 2 (Bulla *et al.*, 1977):

Cuadro 2: Composición de aminoácidos y carbohidratos de la proendotoxina de *B. thuringiensis* y sus componentes de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Bulla *et al.*, 1977).

Aminoácido o azúcar	Proendotoxina ^a			Residuos (g) de componentes SDS-PAGE 1, 2 o 3 ^c
	Residuos (g)/100 g de cristal ^b	Peso molecular Mol/mínimo	Mol/ subunidad	
Ácido Aspártico	12.4	14.0 (14)	129	11.9
Treonina	5.5	7.1 (7)	65	4.9
Serina	5.9	8.5 (9)	83	6.2
Ácido Glutámico	13.1	13.2 (13)	120	15.2
Prolina	2.8	3.8 (4)	37	3.4
Glicina	3.6	8.2 (8)	74	4.8
Alanina	3.3	6.0 (6)	55	3.3
Cistina-mitad ^d	1.4	1.8 (2)	18	5.8
Valina	5.8	7.6 (8)	74	5.0
Metionina ^d	0.9	0.9 (1)	9	8.8
Isoleucina	5.4	6.2 (6)	55	4.9
Leucina	7.7	8.6 (9)	83	3.6
Tirosina	5.7	4.5 (5)	46	1.8
Fenilalanina	5.0	4.4 (4)	37	6.6
Lisina	2.8	2.8 (3)	28	
Histidina	1.9	1.8 (2)	9	
Arginina	10.3	8.6 (9)	83	
Triptófano ^e	1.7	1.2 (1)	9	
Peso Molecular Polipéptido		12,400	114,400	
Glucosa ^f	3.8	3.0 (3)	28	
Manosa ^f	1.8	1.4 (1)	13	
Peso Molecular ^g		13,100	121,100	

^a Valores de la media determinados a partir de seis análisis realizados en hidrolizados de 24, 48 y 72 h; los valores más cercanos al valor íntegro en nanomoles está expresados en paréntesis. Valores obtenidos a partir de análisis individuales caen dentro del 10% de la media.

^b Valores de la media determinados de tres análisis cada uno realizado en hidrolizados de 24 h. Mitad-cisteína, metionina, tirosina y triptófano no fueron estables para hidrólisis.

^c Normalizado para 3.3 g de alanina para comparación con residuos gram de proendotoxina (columna 1).

Electroforesis en gel de poliacrilamida:

^d Determinado como ácido cistéico y sulfato de metionina luego de oxidación con ácido perbórmico.

^e determinado por hidrólisis en ácido p-toluenosulfónico.

^f Determinado por cromatografía de gas-líquido de hidrolizado ácido.

^g Valor mínimo de peso molecular basado en la composición del íntegro más cercano. Subunidades de peso molecular determinadas por análisis físicos.

Los residuos más abundantes son el ácido glutámico y el ácido aspártico. El análisis cuantitativo de las hexosas neutras por cromatografía gas-líquido, reveló que la glucosa (3.8%) y la manosa (1.8%) cuentan por todos los carbohidratos presentes. No se detectaron amino azúcares, lípidos, ácidos nucleicos o derivados de ácido siálico (Bulla *et al.*, 1977).

El menor peso molecular posible para la glicoproteína parasporal, basado en valores de un único íntegro de metionina, triptófano y manosa es 1.3×10^4 Da y consiste de 111 aminoácidos y cuatro azúcares. Se encontró que la protoxina es extremadamente insoluble y se han utilizado mezclas de SDS, urea o hidrocloreuro de guanidina y un agente reductor tal como 2-mercaptoetanol para poder solubilizarlo (Bulla *et al.*, 1977).

La electroforesis de la protoxina solubilizada produce una banda principal de glicoproteína en geles de poliacrilamida-SDS (banda 1, Figura 8) con un peso molecular aparente de 1.35×10^5 Da, así como otras varias bandas menores, todas menos una (banda 4, Figura 8) la cual es de un mayor tamaño molecular. Los patrones de migración de los componentes más pesados (bandas 2 y 3, Figura 8) indican una asociación de la glicoproteína principal debido a sus movilidades relativas y corresponden a formas oligoméricas de la subunidad de 1.35×10^5 Da (Bulla *et al.*, 1977).

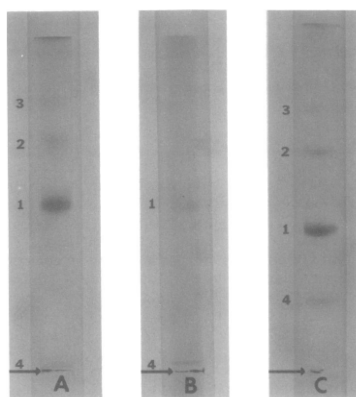


Figura 8: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS del cristal parasporal de *B. thuringiensis*. (A) Poliacrilamida al 5% bufferada en Tris-glicina (pH 8.4) y teñida con azul brillante de Coomassie, 12 μ g de proteína aplicada; (B) lo mismo que (A) excepto que fue teñido con reactivos de ácido peryódico de Schiff, 100 μ g de proteína aplicada; (C) poliacrialmida al 3% bufferada en fosfato (pH 7.0) y teñido con azul brillante de Coomassie, 12 μ g de proteína aplicada. Las flechas indican el punto de migración del tinte rastreador durante la electroforesis (Bulla *et al.*, 1977).

El peso molecular estimado del material en la banda 4 varía de 1×10^4 a 7×10^4 Da, dependiendo del pH del solubilizante y los buffers de corrida. Todos los componentes individuales (bandas 1 y 3, Figura 8) separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS mostraron un perfil de aminoácidos casi idéntico al del cristal completo (cuadro 2, columnas 1 y 4). Esto comprueba que los polipéptidos 1 y 4 en el gel B (Figura 8), contiene grupos hidroxilo vecinales característicos de las hexosas neutrales, tales como glucosa y manosa. El peso molecular promedio de la subunidad cristalina es de 1.2×10^5 (Bulla *et al.*, 1977).

a. Solubilidad del cristal parasporal de *Bacillus thuringiensis*. La solubilización del cristal depende de la concentración del ión hidróxido y es acompañado de la liberación de protones, necesitando del uso de un solvente de una capacidad buffer relativamente alta o la adición de iones de hidróxido para mantener el pH. Los componentes solubles son generados a partir de la glicoproteína al aumentar el pH del solvente (Bulla *et al.*, 1977).

Péptidos (peso molecular $\leq 7 \times 10^4$ Da) aparecen en solución luego de que la protoxina es incubada por 30 minutos a valores de pH mayores de 9, mientras que nada aparece en valores de pH cercanos a la neutralidad o menores. A un pH de 11.5, sólo cantidades en traza de la subunidad de la glicoproteína principal sobreviven luego de 30 minutos. La electroforesis de esta preparación muestra una mancha bastante amplia en la parte inferior del gel revelando que ocurre una degradación sustancial. La glicoproteína es también inestable en pH neutros (Bulla *et al.*, 1977).

C. Control biológico de insectos

Los bioinsecticidas están siendo usados como una alternativa a los insecticidas sintéticos. Los bioinsecticidas principales disponibles son: *B. thuringiensis*, hongos, nemátodos parásitos de insectos y las bacterias entomopatógenicas. *B. thuringiensis* forma parte del 90% de los bioinsecticidas del mercado; produce toxinas insecticidas llamadas endotoxinas delta que son proteináceas y son rápidamente biodegradables (Chattopadhyay, 2004).

De esta manera tiene una corta vida media dentro de la sección intermedia del sistema digestivo del insecto. Los insecticidas basados en *B. thuringiensis* tienen ciertas desventajas. Puesto que matan insectos únicamente en una fase específica de su ciclo de vida, su tiempo de aplicación es crucial. Adicionalmente, debe ser ingerido por el insecto para que actúe, carecen de un amplio rango de grupo blanco (una variedad de *B. thuringiensis* matará un solo tipo de peste de la cosecha), es degradado bajo la luz del sol, y puede que no persista lo suficiente como para estar en contacto con el insecto (Chattopadhyay, 2004).

Los productos comerciales de *B. thuringiensis* son polvos comprimidos o una mezcla de esporas secas y toxinas de proteínas de cristal y estos son aplicados en áreas como hojas y raíces donde los insectos se alimentan. Los productos comerciales contienen cerca de 2.5×10^{11} esporas viables por gramo. Se sabe que estos productos pierden su efectividad hasta cierto grado cuando son guardados por más de 6 meses. De hecho, los productos comerciales de *B. thuringiensis* son incompatibles con: captafol, dinocap, nutrientes foliares y sustancias alcalinas. Además las toxinas de *B. thuringiensis* son rápidamente degradadas por la luz ultravioleta (su vida media bajo la luz del sol es de 3.8 horas) y pueden ser lavadas por la lluvia o por la irrigación (Chattopadhyay, 2004).

B. thuringiensis se ha convertido en un bioinsecticida de mucha importancia agroeconómica y está clasificado con una toxicidad de pesticida clase III (ligeramente tóxico). Posee varias ventajas sobre los insecticidas sintéticos: i) es prácticamente no tóxico para humanos, la exposición de humanos a 1 g por día de *B. thuringiensis* no mostró efectos (sin embargo las formulaciones de *B. thuringiensis* pueden causar irritación de ojos y piel); ii) las toxinas de *B. thuringiensis* son seguras para todos los insectos y animales beneficiosos, no se conoce que causen daño a las plantas genéticamente modificadas; iii) son biodegradables e inmóviles y no se filtran hacia el agua subterránea, por lo que así no persisten en el ambiente comparadas con los insecticidas sintéticos; iv) Las toxinas de *B. thuringiensis* son altamente específicas con las diferentes cepas produciendo toxinas contra diferentes órdenes de insectos (Chattopadhyay, 2004).

D. Insectos blanco de *B. thuringiensis* en su acción como biopesticida

Bacillus thuringiensis se caracteriza por la producción durante la esporulación de inclusiones paraesporales cristalinas que contienen proteínas insecticidas. El espectro de actividad de estas proteínas incluye al menos tres órdenes, Lepidóptera, Coleóptera y Díptera así como nemátodos (Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995).

Las proteínas cristalinas han sido clasificadas de forma general con base a su especificidad por ciertos insectos y sus secuencias de amino ácidos. Las proteínas *cryI* son definidas como aquellas tóxicas a insectos lepidópteros, con las proteínas *cryII* siendo tóxicas tanto para insectos lepidópteros como para dípteros. Las proteínas *cryIII* son activas en contra de coleópteros y las proteínas *cryIV* son tóxicas para dípteros del suborden Nematocera. Un tipo más nuevo, las *cryV*, son reconocidas con base a su actividad dual ya que son activas en contra de insectos lepidópteros y de insectos coleópteros (Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995).

De las subespecies de *B. thuringiensis* reconocidas, la var. *kurstaki* es tóxica para la polilla gitana, el saltador del repollo y las orugas (“caterpillar”) (orden Lepidóptera), var. *israelensis* es tóxico para mosquitos, moscas negras, larvas mosquito de hongo y algunos mosquitos chupa sangre (“midges”) (orden Díptera), la var. *tenebrionis* (también llamada var. *san diego*) es efectiva en contra del escarabajo de la papa de colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), escarabajo de la hoja del elmo y los escarabajos de cápsula (*Anthonomus grandis*) y la var.

aizawai es efectiva en contra de las larvas de la polilla de la cera y las orugas de mariposa (“caterpillar”) (orden Lepidóptera) (Chattopadhyay, 2004).

Estudios recientes de biología molecular empiezan a proveer claves para los posibles orígenes de la diversidad de subespecies y de las proteínas insecticidas que caracterizan a esta bacteria. Los genes de las proteínas insecticidas han mostrado que son transportados en plásmidos conjugados y están arreglados en racimos o en operones flanqueados por secuencias de inserción. Esta organización particular puede facilitar la recombinación y el intercambio de plásmidos, proveyendo un mecanismo potencialmente importante para la generación de nuevas especificidades (Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995).

1. Efectos de su acción insecticida dentro del insecto. El epitelio de la sección media del sistema intestinal de las larvas de insectos del orden Lepidóptera, transporta activamente iones de potasio (K^+) de la hemolinfa al lumen. Esta actividad, es mediada por un tipo de protones vacuolares AT y acoplada en fase con el intercambiador electrogénico de K^+/H^+ , ambos localizados en la membrana apical de las células cáliz, manteniendo una fuerte diferencia de potencial por todo el epitelio. A cambio de esto, el componente del gradiente electroquímico de K^+ generado en toda la membrana apical sirve para mantener la fuerza de empuje para la absorción del lumen de solutos tales como aminoácidos por medio de células columnar (Peyronnet *et al.*, 1997).

Al formar canales en la membrana apical, se piensa que las toxinas de *B. thuringiensis* causan que el gradiente electroquímico colapse, aboliendo así la capacidad de las células de transportar solutos y permitir el equilibrio del pH entre el citoplasma y el contenido altamente alcalino del lumen (Peyronnet *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que la disrupción del epitelio de la sección media del sistema digestivo del insecto resulta en un prolongado cese a la ingesta de alimentos y lleva a la eventual muerte por inanición. Un mecanismo de muerte alternativo propuesto, es que la lisis extensa provee el acceso a las esporas al ambiente más favorable constituido por el hemocele (Broderick, 2006).

Se ha encontrado que la flora residente de la sección media del sistema digestivo de las larvas de Lepidóptera contribuyen a la mortalidad asociada con el consumo de *B. thuringiensis*. Se ha demostrado que la actividad insecticida es anulada al eliminar la comunidad bacteriana

detectable en la sección media del sistema digestivo; en cambio la actividad insecticida es reestablecida al reincorporar a *Enterobacter* sp., un miembro normal de la comunidad de la sección media del sistema digestivo (Broderick, 2006).

Estos resultados, junto con las observaciones de que *Enterobacter* sp. y *E. coli* crecieron rápidamente en la hemolinfa de la larva, mientras que *B. thuringiensis* no creció, indican que las bacterias entéricas son responsables de la septicemia asociada con la toxicidad de *B. thuringiensis* (Broderick, 2006).

Las bacterias endémicas por sí solas no inducen la mortalidad, sugiriendo que *B. thuringiensis* permite que ellas lleguen al hemocele al permeabilizar el epitelio del intestino. Estos resultados sugieren que la toxicidad de *B. thuringiensis* depende de una interacción con microorganismos de la comunidad normal del intestino (Broderick, 2006).

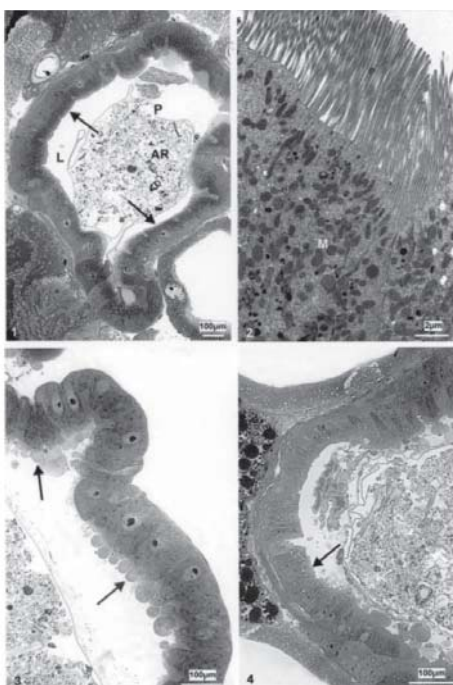


Figura 9: Foto 1) Membrana de borde de cepillo continua (flechas) caracteriza el epitelio de la sección intermedia del sistema digestivo de larvas control de *Simulium pertinax*. L: lumen intestinal; P: membrana peritrófica; AR: residuos alimenticios; sección semidelgada; Foto 2) Sección longitudinal de los microvellos de las células columnares de la sección intermedia del sistema digestivo en una larva control de *S. pertinax*. M: mitocondria; micrografía electrónica de transmisión; Foto 3) Células columnares de la sección intermedia de una larva luego de tratamiento por 2 h con suspensión 2 mg/L de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti). Note la hinchazón y la fuerte emisión de burbujas secretadas (flechas); Foto 4) Células columnares de la sección intermedia del sistema digestivo de una larva luego del tratamiento por 4 h con suspensión 2 mg/L de Bti. Note la fuerte vacuolización de las células columnares, bordes de cepillo parcialmente no alterados (flecha) y células columnares fuertemente alteradas con burbujas secretadas (Cavados *et al.*, 2004).

Se han encontrado alteraciones histológicas en algunas células columnares del epitelio de la sección intermedia del sistema digestivo de larvas de *S. pertinax*, durante la exposición a la endotoxina de por ejemplo *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) (ver Figura 9) (Cavados *et al.*, 2004).

Sin embargo, luego de 4 horas de acción de la toxina se han encontrado grupos de células bien preservados localizados en la base del epitelio cercano a la membrana basal indicando que la recuperación celular estaba en progreso. Al aumentar la concentración de la endotoxina (4 mg/L) casi todas las células columnares fueron afectadas luego de tres horas de exposición (ver Figura 10), a la toxina de por ejemplo *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti), y ningún grupo de células preservadas fueron detectadas cerca de la membrana basal de la sección intermedia del sistema digestivo, aunque la larva todavía no había muerto. Cuando se aplica una solución 6 mg/L de endoxina, todas las larvas mueren (Cavados *et al.*, 2004).

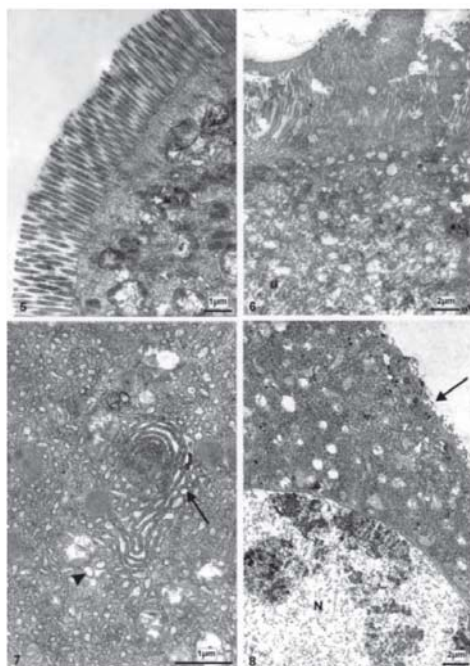


Figura 10: Foto 5) célula columnar de la sección media del sistema digestivo de una larva luego de tratamiento por 3 h con suspensión 2 mg/L de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti). Note microvellos no alterados pero note además fuertes alteraciones en la estructura del citoplasma y de los organelos; micrografía de transmisión electrónica; Foto 6) células columnares de la sección intermedia del sistema digestivo de la larva luego de tratamiento por 4 h con suspensión 2 mg/L de Bti. Note a los microvellos fuertemente alterados y sustancias secretadas entre y también la vacuolización celular; Foto 7) célula columnar de la sección intermedia del sistema digestivo de una larva luego de tratamiento por 2 h con suspensión 2 mg/L de Bti. Note la proliferación de vesículas derivadas del retículo endoplásmico rugoso (flecha) que en secuencia pierde su ribosoma (cabeza de la flecha); Foto 8) célula columnar de la sección intermedia del sistema digestivo de una larva luego de tratamiento por 2 h con suspensión 2 mg/L de suspensión de Bti. Note la cromatina fragmentada adentro del núcleo (N), la vacuolización del citoplasma y la membrana con borde de cepillo destruida (flecha) (Cavados *et al.*, 2004).

E. Efectos secundarios en humanos de su uso como biopesticida

A pesar de un largo record de inocuidad, existe preocupación sobre la potencial patogenicidad de *B. thuringiensis* en los humanos. Esto debido a las infecciones esporádicas, pero algunas veces severas, causadas por este organismo, que incluyen: diarrea por envenenamiento de alimentos, úlceras córneas, celulitis y quemaduras así como heridas de guerra. Su patogenicidad ha sido demostrada en un modelo animal de infección al administrar esporas a un ratón por medio de una inoculación vía nasal (Ghelardi *et al.*, 2002).

Similar a *B. cereus*, *B. thuringiensis* produce una variedad de factores de virulencia, que incluyen fosfolipasa C fosfatidilcolina-prefiriendo (PC-PLC) y fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica, hemolisinas y enterotoxinas (Ghelardi *et al.*, 2002).

F. Identificación de *B. thuringiensis*

1. Identificación a nivel microscópico de *B. thuringiensis*

a. Tinción de cristales con azul de Coomassie. El colorante de azul de Coomassie se une a las proteínas por medio de interacciones electrostáticas entre el tinte y los aminoácidos. Esta interacción sugiere que el tinte interactúa a través de grupos sulfónicos cargados y las cargas positivas de la proteína, interacciones hidrofóbicas con los residuos de aminoácidos adyacentes a la columna vertebral de enlaces peptídicos probablemente tiene lugar. El número de moléculas de Coomassie unidas es aproximadamente proporcional al número de grupos cargados positivamente en la proteína (Tal *et al.*, 1980).

El colorante azul de Coomassie se une a las proteínas en pH ácido por dos medios, Figura 11. El grupo trifenilmetano se une a las estructuras no polares en las proteínas, y el anión de los grupos sulfonados interactúa con las cadenas laterales catiónicas (ej., cadenas laterales de arginina y lisina) en pH ácido (Lovrien, 1995).

El cambio de color producido cuando el colorante se une a las proteínas proporciona una medida total de las proteínas, el cual es muy sensible en el caso de albúminas y ciertas proteínas globulares (Lovrien, 1995). En el caso de *B. thuringiensis*, muchas cepas forman cristales proteicos bipiramidales altamente entrelazados, generalmente compuestos de una a tres cadenas

proteicas de alto tamaño molecular e insolubles debido a la presencia de 10-12 enlaces disulfuro por cada subunidad de 130-150 KDa; además del alto contenido de sulfhidrilos libres. Debido a esto es que los cristales de *B. thuringiensis* son visibles al ser teñidos con azul de Coomassie (Couche *et al.*, 1987).

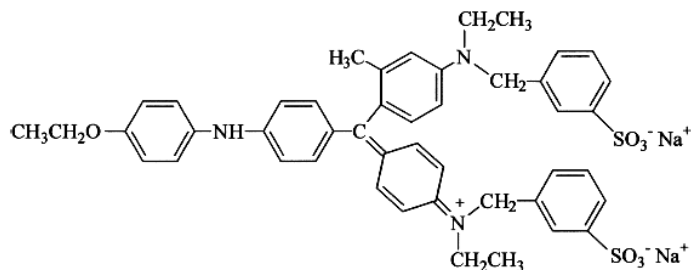


Figura 11: Molécula de azul de Coomassie G-250 (Taylor, 1959).

En su forma de sal sódica, es soluble en agua y las soluciones son estables al ser almacenadas y puede ser esterilizado por autoclave. El máximo de absorción de luz por el azul de Coomassie en solución acuosa ocurre en un rango de 565-570 nm (Taylor, 1959).

2. Identificación a nivel molecular de *B. thuringiensis*

a. Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR). La reacción en cadena de la polimerasa, conocida también como PCR, permite replicar en pocas horas miles de veces el ADN que se encuentra en pequeñas cantidades. El PCR involucra principalmente, la combinación de una muestra de ADN con “iniciadores”, “cebadores” o primers oligonucleótidos, trifosfatos desoxinucleótidos y la polimerasa termoestable de ADN *Taq* en un buffer adecuado, luego repetitivamente calentando y enfriando la mezcla por varias horas hasta que se alcanza la cantidad de amplificación deseada (Erlich, 1989).

El método se basa, en su forma más simple, en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como "desnaturalización". En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el "apareamiento" de cada una de las dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata

de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina iniciadores deben ser complementarios al tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde (Satz, 1993).

En tercer lugar, una enzima ADN polimerasa extiende los primers, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquélla a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa (72°C es la ideal). Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento y extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los iniciadores o primers (Satz, 1993).

1) ADN polimerasa (*Taq*). La disponibilidad de una ADN polimerasa termoestable aislada de la bacteria termofílica especie *Thermus aquaticus* (*Taq*) ha simplificado de gran manera el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de ADN (Mullis *et al.*, 1994). La ADN Taq polimerasa puede resistir repetidas exposiciones a altas temperaturas (94 a 95°C) requeridas para la separación de la cadena; esta propiedad eliminó la necesidad de agregar enzima en cada ciclo y simplificó los requerimientos de instrumentación para PCR (Mullis *et al.*, 1994).

a) *Thermus aquaticus*. La cepa *T. aquaticus* YT1, un termófilo capaz de crecer a temperaturas de 70-75°C, fue aislada de un manantial de agua caliente del parque nacional de Yellowstone, Estados Unidos. La cual ha descrito actividad de la ADN polimerasa con una masa molecular estimada de 60 a 68 kDa y una actividad inferida específica de 2000 a 8000 unidades/ mg de este organismo (Mullis *et al.*, 1994).

Dependiendo de la naturaleza del patrón de ADN, la ADN polimerasa *Taq* tiene una aparente T_{opt} de 75 a 80°C con una actividad específica cercana a 150 nucleótidos por segundo por molécula de enzima. Se ha reportado además una alta procesabilidad y una velocidad de

extensión de >60 nucleótidos por segundo a 70°C y 24 nucleótidos por segundo a 55°C con la ADN polimerasa *Taq* en el fago ADN M13 cuando se usa un primer 30-mer rico en G+C. A temperaturas más bajas, la ADN polimerasa *Taq* tiene actividad de extensión de 1.5 nucleótidos por segundo a 37°C y ~0.25 nucleótidos por segundo a 22°C, y ahí hay una marcada atenuación en la aparente procesabilidad. La dependencia de la temperatura de la procesabilidad puede reflejarse en un imposibilidad de la ADN polimerasa *Taq* de extenderse a través de regiones de la estructura secundaria del patrón o un cambio en la constante de radio de la constante de disociación (Mullis *et al.*, 1994).

Se observa muy poca síntesis de ADN a temperaturas >90°C (ver cuadro 3). La síntesis de ADN a tan altas temperaturas *in vitro* debe limitarse por la estabilidad del patrón primer duplex. Aunque la ADN polimerasa *Taq* tiene un actividad limitada arriba de 90°C, la enzima es relativamente resistente a la desnaturalización durante la exposición a altas temperaturas (Mullis *et al.*, 1994).

Cuadro 3: Vida media de la ADN *Taq* polimerasa a temperaturas elevadas (Mullis *et al.*, 1994).

Temperatura (°C)	T _{1/2} (min)
92.5	130
95.0	40
97.5	5-6

2) Buffer de PCR y cloruro de magnesio (MgCl₂). El buffer como medio en cual se lleva a cabo la reacción de la amplificación de la porción de ADN que interesa multiplicar, determina en todos los casos, ya sea por cantidad o composición el éxito o el fracaso de la PCR o bien también el rendimiento del mismo como resultado final de la reacción de la cadena de polimerasa. En particular la concentración de MgCl₂, que puede tener un efecto profundo en la especificidad y en el rendimiento de la amplificación (Erlich, 1989).

Al considerar la cantidad de Mg⁺² para agregar a la reacción, es importante tener presente que se debe alcanzar un balance entre la concentración total de Mg⁺² y la concentración dNTP. Para optimizar la concentración del buffer de PCR multiplex se deben llevar a cabo una serie de titulaciones de diferentes concentraciones de enzima y de iniciadores o primers, y luego se titulan los niveles de dNTP y Mg⁺². Se obtuvieron resultados óptimos con 6.7 mM de Mg⁺², y este nivel se utiliza para determinar la concentración óptima de dNTP (Innis *et al.*, 1990). Generalmente, el exceso de Mg⁺² resultará en la acumulación de productos de amplificación no específicos e

insuficiente Mg^{+2} reducirá el rendimiento. Recientemente, se ha demostrado que la reducción o eliminación de KCl y gelatina pueden ser beneficiosas. Algunos protocolos incluyen 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) que reduce visiblemente la estructura secundaria del ADN del blanco; aunque también se ha demostrado que la DMSO puede inhibir débilmente a la *Taq* polimerasa y disminuir el rendimiento total del producto de amplificación (Erlich, 1989).

3) Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). Los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) utilizados por la ADN polimerasa, para extender los iniciadores o primers, deben encontrarse en las cantidades adecuadas dentro del buffer de PCR. Están usualmente presentes entre 50 a 200 μM de cada uno. Mayores concentraciones pueden tender a promover incorporaciones incorrectas por la polimerasa (i.e., “infidelidad termodinámica”) y deben evitarse. Con 50 a 200 μM , hay suficiente precursor para sintetizar aproximadamente 6.5 y 25 μg de ADN, respectivamente (Erlich, 1989 y Innis *et al.*, 1990). Los dNTP parecen enlazarse cuantitativamente al Mg^{+2} y la cantidad de dNTP presente en la reacción determinará la cantidad de magnesio libre disponible. En la reacción estándar, los cuatro trifosfatos son agregados a una concentración final de 0.8 mM; esto deja 0.7 mM de los originales 1.5 mM $MgCl_2$ que no están acomplejados con los dNTP (Erlich, 1989).

b. Polimorfismo conformacional de hebra única (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP). El polimorfismo conformacional de hebra única (SSCP, por sus siglas en inglés) es una técnica simple pero poderosa para identificar cambios en una secuencia de cambios en ADN amplificado. Está basada en el principio de que una sola mutación puntual puede alterar la conformación de una hebra simple de ADN causando cambios en la movilidad del mismo, pudiéndose detectar en bandas anormales en geles no desnaturizantes de poliacrilamida. Las mutaciones presentadas en forma de estas bandas son luego caracterizadas por medio de secuenciación del ADN (Fujita, 1994; Leren *et al.*, 1993 y Kasuga *et al.*, 1995).

1) Sensibilidad. Debido a que los resultados reportados son siempre particulares a fragmentos específicos y cambios de secuencias, las generalizaciones para esta técnica son problemáticas. Las mutaciones que no muestran cambios de movilidad bajo ciertas condiciones, puede ser reveladas en otras condiciones diferentes (Fujita, 1994). La sensibilidad de la técnica de SSCP en los análisis es alta (frecuentemente >90%) para fragmentos cortos de ADN (< 200 pb). Sin embargo, la detección de mutaciones puntuales es dependiente de varios factores. Estos incluyen el largo del fragmento, la concentración del agente entrelazante, la presencia de glicerol,

la temperatura durante la electroforesis y la concentración del buffer (Leren *et al.*, 1993 y Kasuga *et al.*, 1995).

Los rangos de concentración para la acrilamida usualmente están entre: 4-12% de bis-acrilamida (el agente entrelazante) y entre 2-3.4% de la concentración de la acrilamida estas concentraciones han sido reportadas como beneficiosas para circunstancias particulares, como cuando se tienen aditivos tales como: glicerol 5-10%, urea o formamida 5% y dimetilsulfóxido o sucrosa 10% (Fujita, 1994).

Alteraciones en la temperatura de corrida del gel de 4-37°C y cambios en la concentración de buffer (posiblemente llevando a cambios en la temperatura de corrida del gel) pueden también ayudar (Fujita, 1994). Este es el factor más importante, esto es debido a la formación de enlaces interhebra, y por lo tanto la conformación del ADN de simple hebra es dependiente de la temperatura. La temperatura durante la electroforesis puede modificarse alterando la temperatura ambiental o al alterar la potencia durante la corrida (Leren *et al.*, 1993).

2) Complicaciones. Ocasionalmente, una hebra es separada en dos o mas bandas en el gel de SSCP, aunque la secuencia sea la misma. Esto sugiere que las hebras que tienen la misma secuencia pueden tener diferentes conformaciones estables. Usualmente la intensidad de estas bandas de confórmeros pueden ser diferentes, pero el ratio de intensidad entre ellos es constante de muestra a muestra. Por lo tanto, cada conformación secuencia-diferente puede ser fácilmente diagnosticada. En casos raros, una o ambas hebras son detectadas como rastros o “smears” en vez de bandas (Hayashi, 1991).

Posibles explicaciones son: i) que las hebras están en un estado transicional de dos (o más) bajo las condiciones electroforéticas, y una sutil diferencia de condiciones en el gel, tal como la diferencia de temperatura entre la región cercana al plato de vidrio y la mitad del gel, es suficiente para permitir diferentes conformaciones; ii) las hebras están en equilibrio de dos (o más) conformaciones, y cambiar a otras conformaciones es poco frecuente para ser promediado durante la electroforesis (Hayashi, 1991).

c. Tinción de plata para el análisis del polimorfismo conformacional de hebra única (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP). La tinción de plata es cerca de 50 a 100 veces más sensible que la tinción de azul de Coomassie; sin embargo las respuestas a la tinción

pueden variar considerablemente. Luego de la fijación alcohol/ácido y el tratamiento con el nitrato de plata, el gel es revelado hasta que la intensidad deseada es lograda. Debido a que la intensidad absoluta de la tinción es controlada por el tiempo de reacción en el revelador, y por ello la intensidad de la tinción es variable, no se aconseja estimar la cantidad de, ya sea proteína o ácidos nucleicos utilizando la tinción de plata, a menos que cantidades conocidas se estén utilizando en el mismo gel para calibrar la intensidad de la tinción (Echan, 2004). Este tipo de tinción se basa en la unión de la plata, en el caso de las proteínas, a las cadenas laterales de los aminoácidos y en el caso de los ácidos nucleicos en la unión de la plata al esqueleto de fosfatos cargado negativamente (Echan, 2004).

d. Electroforesis

1) Generalidades. Es un método de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas, en el seno de una disolución amortiguadora a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante. Se ha aplicado a un conjunto de problemas de separaciones analíticas difíciles: aniones y cationes inorgánicos, aminoácidos, catecolaminas (aminas activas, hormonas proteicas), fármacos, vitaminas, carbohidratos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos, polinucleótidos y otras especies (Skoog *et al.*, 2001).

2) Fundamento. El campo eléctrico actúa solamente sobre los iones. Si dos especies difieren, bien en la carga o en las fuerzas de rozamiento, se moverán a través del tampón y se separarán. Las especies neutras no se separan. La fuerza de retardo por rozamiento se determina en un analito cargado, a partir del tamaño y de la forma del ión y de la viscosidad del medio en el cual migra. Para iones del mismo tamaño la fuerza impulsora será mayor, en el de mayor carga, y tendrá una velocidad de migración más rápida. Para los iones que presenta la misma carga la fuerza de retardo por rozamiento será más pequeña, en el ion más pequeño, y tendrá una velocidad de migración más rápida. La relación carga-tamaño de los iones combina estos dos efectos (Skoog *et al.*, 2001).

3) Mecanismos de separación.

a) Geles de agarosa. La electroforesis en gel de agarosa es el método estándar para la separación de moléculas de ADN o ARN de diferentes longitudes. La agarosa es

un polisacárido que forma geles con poros que van desde 100-300 nm de diámetro, el tamaño depende de la concentración de agarosa en el gel. La concentración del gel por lo tanto determina el rango de fragmentos de ADN que pueden ser separados (Brown, 2006).

Un gel de agarosa es preparado al mezclar la cantidad apropiada de polvo de agarosa en una solución de buffer, calentando para disolverla, y luego vertiéndola en el *cassette* o molde apropiado. Se coloca un peine en el gel para formar los pozos para las muestras. Se deja enfriar para que solidifique y luego se lleva a cabo la electroforesis con el gel sumergido en buffer. Para seguir el progreso de la electroforesis, uno o dos tintes, con velocidad de migración conocida son agregados a las muestras de ADN antes de cargar el gel. Las bandas de ADN son visualizadas al sumergir el gel en solución de bromuro de etidio o bien al preparar el gel con bromuro de etidio, este compuesto se intercala entre los pares de bases de ADN y flúorese cuando es activado por radiación ultravioleta (Brown, 2006).

b) Geles de poliacrilamida. Se utiliza para la separación de moléculas de ADN que difieren en longitud por solo un nucleótido. La electroforesis en gel de poliacrilamida es usada para examinar las familias de moléculas cadena-terminadas de ADN resultando en un experimento de secuenciación. La electroforesis en gel de agarosa no puede ser utilizada para este propósito debido a que no tiene el poder de resolución necesario para separar moléculas de hebra única de ADN que difieren en longitud por sólo un nucleótido. Los geles de poliacrilamida tienen un tamaño menor de poros que los geles de agarosa y permiten separaciones precisas de moléculas de 10-1500 pb. Así como secuenciación de ADN, los geles de poliacrilamida son también usados para otras aplicaciones donde se requieren separaciones finas de ADN, por ejemplo en el análisis de loci microsatélites (Brown, 2006).

Un gel de poliacrilamida consiste de cadenas de monómeros de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) entrelazadas con unidades de N,N'-metilenbisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$), la última es comúnmente llamada "bis". El tamaño del poro está determinado por la concentración total de ambos monómeros (acrilamida + bis) y la razón de acrilamida a bis. Una concentración de gel al 8% se utiliza para leer una secuencia cercana a la de un primer (una resolución de moléculas de 50-400 nucleótidos de longitud) o disminuirla al 4% para leer una secuencia más distante (500-1500 nucleótidos del primer). La polimerización de la solución de acrilamida: bis es iniciada por el persulfato de amonio (APS) y catalizada por N,N, N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Brown, 2006).

Los geles de poliacrilamida son preparados entre dos placas de vidrio separadas por espaciadores. Este arreglo sirve para dos propósitos. Primero, permite que se haga un gel muy delgado (< 1 mm), que facilita la lectura de la secuencia al aumentar la nitidez de las bandas y segundo, asegura que la polimerización, la cual es inhibida por el oxígeno, ocurra uniformemente a través del gel (Brown, 2006).

4) Electroforesis “nativa” en gel de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE). Electroforesis “nativa” i.e., no desnaturizante, es la electroforesis en ausencia de desnaturizantes tales como detergentes y urea, es un técnica pasada por alto para la determinación del tamaño nativo, estructura de subunidades y separación óptima tanto de proteínas como de ácidos nucleicos. Debido a que la movilidad depende del tamaño, forma y carga intrínseca, la electroforesis no desnaturizante proporciona de un set de parámetros de separación diferente del que proveería otro tipo de electroforesis (Gallagher, 1995).

La separación en un sistema continuo depende del pH; es decir, en el cual el mismo buffer es usado para preparar las soluciones de acrilamida y llenar las cámaras de electroforesis. La opción de pH y de sistema de buffer a usar depende de la molécula a estudiar (i.e., su punto isoeléctrico) y debe ser determinado empíricamente. En general, el sistema debe encontrarse en un pH entre 5.0 y 8.0 para resultados óptimos. Los valores de pH extremos pueden llevar a la precipitación o desnaturización de la molécula. Las concentraciones de acrilamida son determinadas empíricamente, pero a mayor porcentaje de acrilamida, más claras serán las bandas de la molécula (Gallagher, 1995).

G. Métodos para analizar la biodiversidad microbiana

El conocimiento de la diversidad de los microbios esta limitada en parte por la inhabilidad de estudiar los ambientes en donde estos podrían encontrarse, se estima que en un gramo de suelo existen 4000 diferentes “unidades genómicas” bacterianas basadas en la reasociación de ADN-ADN (Kirk *et al.*, 2004).

Existen problemas asociados con el estudio de la diversidad bacteriana. Estos surgen no solo de las limitaciones metodológicas, sino también de la falta de conocimiento taxonómico.

La diversidad de las especies consiste en la riqueza de las especies, el número total de especies presentes, la uniformidad de las especies y la distribución de las mismas. Los métodos para medir la diversidad microbiana pueden ser categorizados en dos grupos: las técnicas bioquímicas y las técnicas moleculares. Los estudios de diversidad incluyen las diversidades relativas de las comunidades a lo largo de un gradiente de estrés, disturbios u otras diferencias bióticas o abióticas (Kirk *et al.*, 2004).

1. Técnicas bioquímicas para el estudio de la diversidad microbiana

a. Conteo en placa. Estos métodos son rápidos, baratos y proveen de información del componente activo y heterotrófico de la población. La limitación está en las condiciones del cultivo adecuadas, la selección del medio, la dificultad de separar las bacterias u hongos de las partículas de suelo o biopelículas y el potencial de inhibición de colonia-colonia o la expansión de la colonia (Kirk *et al.*, 2004).

b. Análisis de ácidos grasos metil ester (FAME). Un método bioquímico que no se basa en el cultivo de microorganismos es el análisis del ácido graso metil ester (FAME). Este método provee de información de la composición microbiana basada en grupos de ácidos grasos. Los ácidos grasos constituyen una porción relativamente constante de la biomasa celular y ciertos ácidos grasos constituyen una firma que puede diferenciar ciertos grupos taxonómicos principales dentro de una comunidad. Por lo tanto, un cambio en el perfil de ácidos grasos representaría un cambio en la población microbiana (Kirk *et al.*, 2004).

2. Técnicas moleculares para el estudio de la diversidad microbiana

a. Contenido de guanina más citosina (G+C). Las diferencias en el contenido de guanina más citosina en el ADN puede ser usado para el estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas. Esto basado en el conocimiento de que los microorganismos difieren en su contenido de G+C y que grupos relacionados taxonómicamente solo difieren entre un 3 y 5%. Este método provee de un nivel de resolución bajo a medida que diferentes grupos taxonómicos pueden compartir el rango de G+C (Kirk *et al.*, 2004).

b. Reasociación e hibridización de ácidos nucleicos. La reasociación del ADN es una medida de complejidad genética de una comunidad microbiana y ha sido usado para estimar su

diversidad. El ADN total es extraído de las muestras, purificado, desnaturalizado y permitido que se hibridice. La velocidad de hibridización o reasociación dependerá de la similitud de las secuencias presentes. A medida que la complejidad o diversidad de las secuencias de ADN aumenta, la velocidad a la cual se reasocia el ADN disminuirá (Kirk *et al.*, 2004).

c. Acercamientos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction, PCR). El PCR con blanco en la región 16S del ADN ribosomal ha sido utilizado extensamente para el estudio de la diversidad de procariontes así como la predicción de las relaciones filogenéticas (Kirk *et al.*, 2004).

1) Polimorfismo de conformación de hebra única (Single strand conformation polymorphism, SSCP). Técnica que se apoya en la separación electroforética basada en las diferencias de las secuencias de ADN. Esta técnica fue originalmente desarrollada para detectar nuevos polimorfismos o mutaciones puntuales en el ADN. El ADN de hebra única es separado en un gel de poliacrilamida basado en las diferencias de movilidad causados por la manera en que su estructura secundaria está empacada. Cuando los fragmentos de ADN son de igual tamaño y no hay desnaturante presente, el empacamiento y por ende la movilidad, dependerán de las secuencias de ADN. Por lo tanto una secuencia puede ser representada como más de una banda en el gel (Kirk *et al.*, 2004).

H. *Bacillus thuringiensis* y la filoesfera

La densidad de población de *B. thuringiensis* en la filoesfera sugiere que esta especie debería de ser considerada una epífita de la filoesfera. También es probable que *B. thuringiensis* sea metabólicamente activa en la filoesfera o en espacios intercelulares. Si *B. thuringiensis* llega a proliferar hasta cierto grado en la filoesfera, se podría decir que ésta puede contribuir a los bajos niveles de mortalidad de larvas en el campo (Smith, 1991).

B. thuringiensis no ha sido reportado como el agente causal en la epizootia de insectos. Se ha propuesto que en vez de causar la epizootia, las poblaciones de *B. thuringiensis* puedan ser tan grandes que puedan servir como antialimentadores de larvas de insectos, por lo tanto ofrece cierto grado de protección a la planta contra larvas de insectos fitófagos. Esta es una relación de comensalismo o de simbiosis en la cual *B. thuringiensis* también se beneficia de ser una epífita de la filoesfera (Smith, 1991).

Por ejemplo la planta puede proveer nutrientes a partir de exudados de las hojas y microflora asociada, además de proveer de un nicho libre de la competencia con otras bacterias esporoformadoras del suelo. En la filoesfera, *B. thuringiensis* es accesible a las larvas de insecto que se alimentan de hojas. Si la larva ingiere suficientes toxinas de esporas o cristales para perturbar su alimentación, la protección de la planta hospedera debida a la defoliación reducida puede funcionar (Smith, 1991).

I. Efectos de la luz ultravioleta y visible en las esporas de *B. thuringiensis*

Se ha comprobado que el cristal de protoxina ha probado ser altamente tóxico, la espora también mata insectos, y ha sido reportado que la efectividad del insecticida aumenta cuando se usa una mezcla de esporas y cristales de protoxinas. Uno de los problemas encontrados al usar a *B. thuringiensis* como insecticida, es su corto periodo de inactividad en el campo, que es debido en parte, a la inactivación del microorganismo por la luz solar. Es aparente que la inactivación de las esporas de *B. thuringiensis* por la luz solar es debida en parte a las longitudes de onda del espectro visible, especialmente aquellas longitudes de onda (cercanas a 400 nm) que las esporas absorben rápidamente (Griego, 1978).

J. Distribución geográfica e importancia económica del aguacate en Guatemala

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 anuales, cuadro 4 (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. 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 generando 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).

El comportamiento histórico de la producción, para el período 1994-2002, en términos generales presenta una tasa media anual de crecimiento TMAC del 5%, que podría considerarse normal; sin embargo, es importante señalar que al evaluar el desempeño de esta variable en el período 2001-2002, se observa un salto cuantitativo significativo, ya que en el 2001 se reportaron 581,700 quintales, mientras que para el 2002 el volumen reportado fue de 785,500; lo cual implica un crecimiento del 30% (MAGA, 2005).

Cuadro 4: Distribución de la producción nacional de aguacate, a nivel de departamento (MAGA, 2005).

Departamento	Número de fincas	Producción obtenida (Quintales)
Total República	57,876	785,463
San Marcos	6,787	114,532
Chimaltenango	5,598	94,606
Quiché	7,624	75,367
Huehuetenango	5,918	58,318
Sololá	2,603	58,010
Sacatepéquez	2,351	52,411
Alta Verapaz	7,501	40,694
Petén	1,577	48,444
Santa Rosa	1,51	34,817
Totonicapán	4,343	33,577
Guatemala	1,486	53,554
Escuintla	1,161	24,300
Suchitepéquez	1,093	23,295
Jutiapa	1,492	17,551
Baja Verapaz	399	16,006
Jalapa	1,394	15,252
Retalhuleu	826	9,112
Izabal	628	8,270
Chiquimula	1,581	7,899
Quetzaltenango	1,032	6,688
El Progreso	471	3,649
Zacapa	560	1,031

Este fenómeno podría tener diversas causas, sin embargo, se considera que la más relevante es que se podría definir como un efecto de la crisis del café, ya que algunos productores de café ante la última crisis de precios, encontraron una alternativa en el aguacate (MAGA, 2005).

El 70% de la producción de las fincas productoras de aguacate se encuentra concentrada en los departamentos de San Marcos, Chimaltenango, Quiché, Huehuetenango, Sololá, Sacatepéquez, Alta Verapaz, y Petén, con un aporte al total de la producción, de alrededor de 550,182 quintales, cuadro 4 (MAGA, 2005).

En el caso particular del departamento de San Marcos, el 70% de la producción de las fincas productoras de aguacate se encuentra concentrada en los municipios de San Rafael Pie de la Cuesta, Nuevo Progreso, Sta. Catarina, San Cristóbal Cucho y San Miguel Ixtahuacán, cuadro 5 (MAGA, 2005).

Cuadro 5: Fincas y producción de aguacate, de los principales municipios productores del departamento de San Marcos. Año agrícola 2002/2003 (MAGA, 2005).

Departamento y municipio	Número de fincas	
Total Departamento	6,787	114332
San Rafael Pie de la Cuesta	123	25,964
Nuevo Progreso	251	24,371
Catarina	183	12,601
San Cristóbal Cucho	177	10,623
San Miguel Ixtahuacán	622	7,273
Resto	5,431	33,501

1. Comercio exterior

a. Importaciones a Guatemala. En lo que respecta al comercio exterior, se observa que durante el período 1996-2005, Guatemala reportó importaciones alrededor de 61,000 quintales anuales; esto implica más o menos una presión del 7% con respecto de la producción nacional. En lo que se refiere al origen, México cubre el 99% de las mismas y en términos de su comportamiento se puede observar que las mismas están creciendo en más o menos 10% cada año (MAGA, 2005).

b. Exportaciones de Guatemala. Al revisar las cifras de las exportaciones, es conveniente tomar en cuenta que en promedio anual durante el período analizado, Guatemala reportó 92,000 quintales (cifra superior a las importaciones); además, Guatemala tiene como principales socios comerciales a los países de la región centroamericana. En cuanto a las tendencias, se observa que Guatemala está perdiendo los mercados de más alto consumo en la región: El Salvador y Costa Rica a un ritmo de más o menos 20% anual, conservando únicamente con crecimiento positivo el mercado de Honduras (MAGA, 2005). Esto debido posiblemente a una baja producción ya sea por pestes o bien debido a que sólo se está produciendo para abastecer el mercado interno. Sin producción de excedentes para la exportación (MAGA, 2005).

2. Consumo Interno en Guatemala. Se confirma el hecho que Guatemala se está preparando únicamente para ser abastecedor del mercado interno. En efecto, un breve análisis de la producción nacional versus el consumo interno, indica que en 1996 se generó una exportación real de 65,000 quintales como producto del diferencial de la producción y el consumo reportado para ese año; mientras que en el año 2002 Guatemala reportó una producción de 785,000 quintales y se estima que el consumo interno para este año fue de más o menos 789,000 quintales, esto implica que Guatemala a partir del 2002 es un país deficitario en el mercado del aguacate; en términos más sencillos, hasta el 2002, la producción nacional de aguacate no ha sido capaz de abastecer su mercado interno y ha perdido presencia en los mercados de la región centroamericana, que son considerados como mercados naturales (MAGA, 2005).

IV. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

- Comprobar la existencia de presuntas cepas nativas guatemaltecas de *Bacillus thuringiensis* en la filoesfera del árbol de aguacate variedad Hass.

B. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar morfológicamente las cepas presuntivas aisladas de la filoesfera del árbol de aguacate.
- Caracterizar molecularmente las cepas presuntivas nativas aisladas, por medio de la secuencia de la región 16S del ADN ribosomal.
- Correlacionar la variabilidad de las cepas aisladas con el nicho y el área ecogeográfica de donde provienen.

V. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país netamente agrícola, y sus exportaciones lo evidencian. El cultivo del aguacate representa para Guatemala 92,000 quintales anuales, pero este cultivo se ve afectado por varias plagas producidas por insectos. Para producir un producto de alta calidad a un bajo precio, Guatemala debe buscar nuevos sistemas de control de plagas económicos y no nocivos al medio ambiente, para evitar un aumento en los costos de producción que por ende elevan el costo final del producto. El exportar productos de alta calidad contribuye a la recuperación de los mercados de alto consumo de la región, tales como: El Salvador y Costa Rica, trayendo consigo mayores divisas y fuentes de trabajo.

Bacillus thuringiensis representa una alternativa para el manejo integrado de plagas, porque reduce la utilización de insecticidas químicos. El espectro de actividad de sus toxinas incluyen al menos tres órdenes de insectos, tales como: Lepidóptera, Coleóptera, Díptera así como Nemátodos. Su acción no es nociva al medio ambiente, debido a que es altamente selectivo y efectivo, una variedad de *B. thuringiensis* eliminará un solo tipo de plaga de la cosecha y la proteína remanente es degradada naturalmente bajo la luz del sol.

El aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* propias del país y su caracterización por medio de técnicas moleculares representa la oportunidad de crear un cepario, de efectuar estudios sobre la especificidad y toxicidad de éstas contra insectos nativos del país y de utilizar dichos aislamientos para crear nuevas formas de bioinsecticidas para las plagas propias del cultivo de aguacate en Guatemala.

VI. MÉTODOS

A. Protocolo para la identificación a nivel microbiológico de *B. thuringiensis*

1. Muestreo de follaje. El sitio para el muestreo de hojas se escogió de tal manera que se minimizara la posible contaminación por contacto con salpicaduras de suelo o bien por inóculo acarreado por el viento y que tuviera protección contra la luz UV.

a. Materiales. Bolsa de polietileno de cremallera plástica.

b. Procedimiento

1) Las muestras de hojas fueron obtenidas en una altura de 2.0-2.5 m sobre el suelo y a 0.3 m adentro del pabellón externo del árbol, y del lado este del árbol. A partir de diez árboles diferentes escogidos al azar.

2) La contaminación cruzada entre las muestras, fue evitada al desprender las hojas mientras estas se encontraban dentro de una bolsa de polietileno de cremallera plástica, la cual fue inmediatamente cerrada para su almacenamiento. Este procedimiento fue llevado a cabo al invertir la bolsa sobre la mano del recolector, tomando las hojas a ser muestreadas y removiéndolas de las ramas¹.

2. Muestreo de suelo y hojarasca

a. Procedimiento

1) Las muestras de suelo fueron tomadas a una profundidad de 0-20 cm. Utilizando una pala o azadón con el cual se cava un agujero en forma de “V” del cual se extrae una porción de la base de diez árboles diferentes elegidos de forma aleatoria en dos fincas, una del departamento de Sacatepéquez y otra del departamento de Alta Verapaz ambas productoras de aguacate Hass (para ver fotos de fincas, ver ANEXO).

2) Las muestras de hojarasca fueron tomadas debajo del mismo árbol de donde se tomó la muestra de suelo, igualmente de forma aleatoria, previo a la toma de las muestras de suelo en ambas fincas.

¹ Smith, R.A. y G.A. Couche. 1991. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. Applied and Environmental Microbiology. 57(1): 311-315 pp.

3. Tratamiento de las muestras

a. Procedimiento. Todas las muestras obtenidas fueron guardadas bolsa de polietileno de cremallera plástica en un refrigerador a 2-4°C luego de su recolección y hasta que fueron procesadas en el laboratorio.

4. Cultivo y aislamiento

a. Aislamiento a partir de muestras de follaje

1) Materiales

- Caldo nutritivo
- Agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID (Chromogenic Agar for *B. cereus* de OXOID)
- Tinción de azul de Coomassie (7 mL de ácido acético, 50 mL de etanol absoluto y 1.0 g de azul de Coomassie G-250 en 100 mL de H₂O totales)
- Tinción de Gram
- Etanol absoluto o al 95%

2) Procedimiento

- a) Se pesaron 0.5 g de hojas de la muestra.
- b) Las secciones de la hoja fueron colocadas en un Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 10 mL de caldo nutritivo y fueron inicialmente agitadas a 250 rpm por 4 horas a 28-30°C y luego fueron dejados toda la noche en incubación a 34 °C.
- c) A las 24 horas los Erlenmeyer con las suspensiones resultantes, fueron colocados en baño maría a 80°C por 15 min para la eliminación de las células vegetativas.
- d) La suspensión tratada con calor se enfrió en hielo por igual cantidad de tiempo, y alícuotas de 10 µL fueron colocadas en cajas Petri con agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID (vertido en caja), e incubadas por 24 horas a 28-30 °C.
- e) Luego de 24 horas, de cada una de las cajas Petri se tomó una muestra de 5 colonias diferentes al azar, las cuales fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas por 24 horas a 28-30°C.

f) A las 24 horas las colonias resultantes fueron fotografiadas para la verificación de su morfología macroscópica y se prepararon muestras en stock de los cultivos puros en 20% de glicerol y se conservaron a -75°C .

g) Luego de 48 horas de incubación a $28-30^{\circ}\text{C}$, se tomó una muestra de las colonias y se preparó un frote con tinción de Gram, para confirmación de su morfología microscópica como bacilos Gram positivo y un frote con tinción de azul de Coomassie para la determinación de la presencia de cristales típicos de este tipo de bacterias².

b. Aislamiento a partir de muestras de hojarasca

1) Material

- Caldo nutritivo
- Agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID
- Tinción de azul de Coomassie (7 mL de ácido acético, 50 mL de etanol absoluto y 1.0 g de azul de Coomassie G-250 en 100 mL de H_2O totales)
- Tinción de Gram
- Etanol absoluto o al 95%

2) Procedimiento. Se asumió la existencia tanto de esporas como de bacterias en la muestra.

a) Para esta técnica se pesaron 0.5 g de hojarasca cortada en pedazos pequeños.

b) La muestra fue colocada en un Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 10 mL de agua peptonada al 1% o caldo de cultivo (dependiendo de las condiciones de la muestra) y fue incubada toda la noche a 34°C .

c) A partir de este inciso en adelante seguir pasos del protocolo para aislamiento a partir de muestras de follaje.

² Niedmann, L. y L. Meza-Basso. 2006. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de Manejo Integrado de la Polilla Del Tomate (*Tuta Absoluta* Meyrick; *Lepidoptera: Gelechiidae*) En Chile. AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE). 66(3): 235-246 pp.

Smith, R.A. y G.A. Couche. 1991. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. Applied and Environmental Microbiology. 57(1): 311-315 pp.

c. Aislamiento a partir de muestras de suelo

1) Materiales

- Caldo nutritivo
- Agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID
- Tinción de azul de Coomassie (7 mL de ácido acético, 50 mL de etanol absoluto y 1.0 g de azul de Coomassie G-250 en 100 mL de H₂O totales)
- Tinción Gram
- Etanol absoluto o al 95%

2) Procedimiento

- a) 0.50 g de la muestra de suelo fue colocada en un Erlenmeyer que contenía 9.5 mL de caldo nutritivo adicionado con 0.5 mL de solución de acetato de sodio 0.25M esta suspensión se dejó para su crecimiento toda la noche a 34°C sin agitación.
- b) A las 24 horas los Erlenmeyer con las suspensiones resultantes fueron colocados en baño maría a 80°C por 15 min para la eliminación de las células vegetativas.
- c) La suspensión tratada con calor se enfrió en hielo por igual cantidad de tiempo, y alícuotas de 10 µL fueron colocadas en cajas Petri con agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID (por vertido en placa), e incubadas por 24 horas a 28-30 °C.
- d) Luego de 24 horas, de cada una de las cajas Petri se tomó una muestra de 5 colonias diferentes, las cuales fueron sembradas en agar nutritivo por 24 horas a 28-30°C.
- e) A las 24 horas las colonias resultantes fueron fotografiadas para la verificación de su morfología macroscópica y se prepararon muestras en stock de los cultivos puros en 20% de glicerol y se conservaron a -75°C.
- f) Luego de 48 horas de incubación a 28-30°C, se tomó una muestra de las colonias y se preparó un frote con tinción de Gram, para la confirmación de su morfología microscópica como bacilos Gram positivo y un frote con tinción de azul de Coomassie para determinar la presencia de cristales típicos de este tipo de bacterias³.

³ Apaydin, O.; A. Fazil; S. Harsa y H. Güneş. 2005. Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **21**: 285-292 pp.

Niedmann, L. y L. Meza-Basso. 2006. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de Manejo Integrado de la Polilla Del Tomate (*Tuta Absoluta* Meyrick; *Lepidoptera: Gelechiidae*) En Chile. *AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE)*. 66(3): 235-246 pp.

Smith, R.A. y G.A. Couche. 1991. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(1): 311-315 pp.

d. Modificación al agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID adicionándole emulsión de yema de huevo *

1) Preparación de emulsión de yema de huevo

a) Materiales

- 100 mL de Agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID
- Un huevo (separando la yema de la clara de manera asépticamente)
- Solución salina estéril (Solución salina isotónica 0.9% de NaCl (sol. salina normal) libre de sustancias pirogénicas)

b) Procedimiento

- 1) Se sumergió el huevo en etanol absoluto o al 95% por 5 min, en un beaker de 400 mL.
- 2) Se lavó con abundante agua destilada, utilizando un beaker de 400 mL para el enjuague y se secó con servilletas autoclaveadas.
- 3) Se partió el huevo asépticamente (i.e., cerca del mechero) utilizando una varilla de vidrio estéril, cuidando de no romper la yema y tratando de separar la clara.
- 4) Se hizo una mezcla de solución salina:yema de huevo a una razón de 2.33 v/v.
- 5) Se depositó la mezcla de yema y solución salina en un Erlenmeyer de 500 mL y se batió la yema con un agitador magnético.
- 6) Luego de batirla bien, se agregaron 5 mL de la emulsión a 100 mL de agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID, cuando éste estuvo a 50°C, para evitar que la emulsión proteica de la yema se desnaturalizara.
- 7) El medio de cultivo se veía opaco y las colonias de *B. thuringiensis* tenían un halo blanquecino alrededor debido a la acción de la lecitinasa (Figura 12)⁴.

⁴ OXOID. Culture Media Supplements, EGG YOLK EMULSION. 2001-2007. [con acceso el 7 de septiembre 2007]. [web en línea: http://www.oxid.com/UK/BLUE/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0047&sec=&org=&c=UK&lang=EN] y

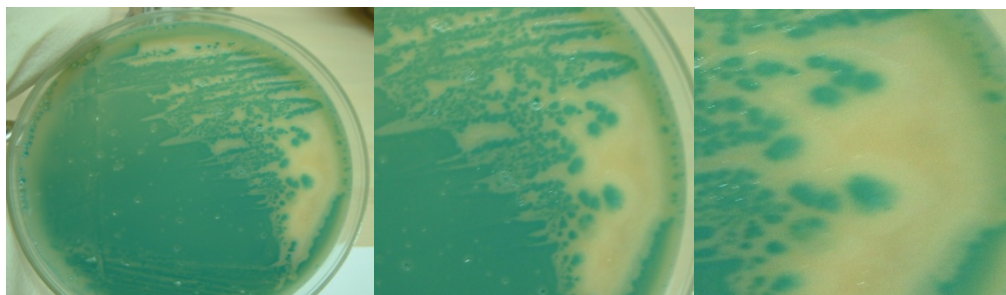


Figura 12: Crecimiento de *B. thuringiensis*, cepa control 6112, en agar cromogénico OXOID modificado. En la tercera foto se observa el halo creado alrededor de las colonias debido a la acción de la lecitinasa, esto ayuda a distinguirlas más fácilmente.

*Esta modificación al medio de cultivo selectivo se realiza cuando se inicia el procesamiento de las muestras del segundo muestreo.

e. Preparación de frotis para su observación a nivel microscópico

1) Tinción con azul de Coomassie

a) Materiales

- Tinción de azul de Coomassie (7 mL de ácido acético, 50 mL de etanol absoluto y 1.0 g de azul de Coomassie G-250 en 100 mL de H₂O totales)
- Etanol al 95-100% (fijación)
- Agua destilada estéril

b) Procedimiento

- Se realizó el frotis tomando una asada de la colonia seleccionada con el asa microbiológica.
- Se diluyó en 70 μ L de agua estéril.
- Se dejó secar al aire
- Se fijó con alcohol 95-100% por 2 minutos⁵.
- Se tiñó por 10 min en solución de azul de Coomassie y se desaguó con agua destilada.
- Se dejó secar para luego ser observado al microscopio óptico

(Figura 13)⁶.

CHROMOGENIC BACILLUS CEREUS AGAR. [con acceso el 7 de septiembre 2007]. [web en línea: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1036&org=9&c=UK&lang=EN].

⁵ Este es el método de fijación recomendado actualmente ya que no causa distorsiones en la célula. Al calentar el portaobjetos (el cual es el método de fijación tradicional) se puede causar distorsiones y evitar que el espécimen se fije bien al portaobjetos (BIOLOG, 2003).

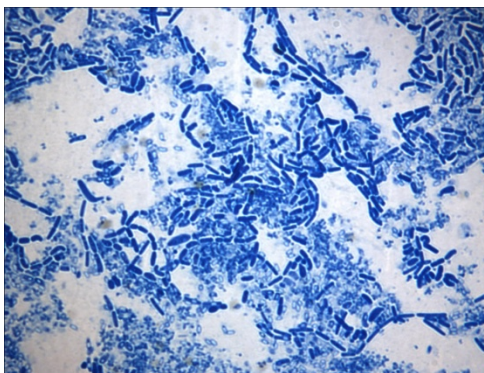


Figura 13: Tinción de azul de Coomassie de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. 1000x. Microscopia parascopal

2) Tinción de Gram

a) Materiales

- Cristal violeta al 1% (1.0 g de de cristal violeta en 100 mL de H₂Od totales).
- Solución yodada de Gram (1.0 g de cristales de yodo, 2.0 g de yoduro de potasio en 300 mL de H₂Od totales).
- Solución de alcohol acetona (2:1)⁷ (10 mL de acetona en 20 mL de alcohol al 95%).
- Solución Stock de safranina (0.5 g de safranina O en 100 mL de etanol al 95% totales).
- Solución de trabajo de safranina (10 mL de solución stock de safranina en 90 mL de H₂Od totales).
- Etanol al 95-100% (fijación)

b) Procedimiento

- Se preparó y se fijó el frotis (en la forma descrita en la tinción de azul de Coomassie).
- Se tiñó con cristal violeta durante un minuto y luego se lavó con agua destilada.

⁶ Niedmann, L. y L. Meza-Basso. 2006. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de Manejo Integrado de la Polilla Del Tomate (*Tuta Absoluta* Meyrick; *Lepidoptera: Gelechiidae*) En Chile. AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE). 66(3): 235-246 pp.

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

⁷ Es un decolorante más rápido que el alcohol etílico al 70%. La decoloración rápida puede ser desventajosa en ciertas bacterias o cuando los microorganismos escasean en el frotis, o bien en manos de técnicos inexpertos (Lynch, 1977).

- Se aplicó como mordiente yodo durante un minuto más.
- Se decoloró con alcohol-acetona hasta que ya no se observó decoloración.

- Se lavó con agua destilada.
- Se volvió a teñir con safranina diluida durante un minuto.
- Se lavó con agua destilada y se dejó secando al aire.
- Se observó el frote al microscopio con el lente de inmersión para su clasificación como Gram positivo o negativo (Figura 14)⁸.

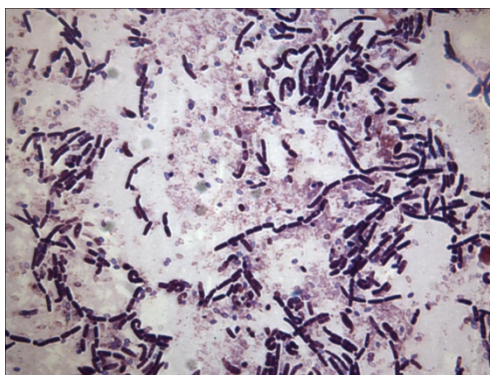


Figura 14: Tinción Gram positivo de Aislado no identificado 1000x. Microscopia parascopal

B. Protocolo para la identificación a nivel molecular de las mutaciones puntuales en la región 16S del ADN ribosomal de *B. thuringiensis*

1. Protocolo para la extracción de ADN

a. UltraClean™, Soil DNA Isolation Kit (catalog # 12800-100, 100 preps) (Mo Bio Laboratories, Inc.). Se utiliza este kit para aislar ADN de 0.25 – 1.0 g de muestras de suelo. Aunque en este caso se utilizó para la extracción de ADN de colonias ya aisladas a partir de muestras de suelo. Se extrajo el ADN a todas las muestras.

1) Equipo

- Micro centrífuga (10,000 x g)

⁸ Álvarez, M. 1998. Laboratorio de Análisis Bacteriológico de Agua, UVG, Protocolos. Universidad del Valle de Guatemala, Instituto de Investigaciones, Guatemala. 40 pp.
Lynch, M.J.; S.S. Rápale; L.D. Mellor; P.D. Spare y M.H.J. Inwood. 1977. Métodos de Laboratorio. 2da ed, Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México. 924-925 pp.

- Pipetas (volumen requerido 50-500 μL)
- Vortex
- Micropipetas eppendorf de 10-1000 μL / puntas 10-1000 μL

2) Reactivos a utilizar. Ver ANEXOS.

3) Procedimiento. Explicación de los pasos ver ANEXOS. Como medida de seguridad se deben utilizar guantes todo el tiempo.

a) Para los tubos con cuentas (Bead Solution tubes) y solución (buffer) de 2 mL, se agregó una asada de la colonia bacteriana de la muestra.

b) Se utilizó el vortex para mezclar.

c) Se revisó la solución S1 (la solución S1 contiene SDS. Si la solución se enfría, precipitará). Debido a que la solución S1 no tenía un precipitado, no se vio la necesidad de calentar la solución a 60°C.

d) Se agregaron 60 μL de la solución S1 y se mezcló por inversión o se utilizó brevemente el vortex.

e) Luego de agregar solución S1, se utilizó el vortex por 3-4 segundos, se calentó a 70°C por 5 min. Se utilizó nuevamente el vortex por 3-4 segs. Se calentó nuevamente por otros 5 min. Vortex por 3-4 segs.

f) Se agregaron 200 μL de Solución Removidora de Inhibidores (IRS, por sus siglas en inglés).

g) Se centrifugaron los tubos de 2 mL a 10,000 x g por 30 seg. Precaución: no se debe sobrepasar las 10,000 x g o los tubos se romperán.

h) Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio. Nota: se esperan entre 400-450 μL de sobrenadante.

i) Se agregaron 250 μL de solución S2 y se utilizó el vortex por 5 segs. Se incubó a 4°C por 5 min.

j) Se centrifugaron los tubos por 1 min a 10,000 x g.

k) Se transfirieron 450 μL de sobrenadante a un tubo de centrifuga nuevo evitando tocar el sedimento.

l) Se agregaron 900 μL de Solución S3 al sobrenadante y se utilizó el vortex por 5 segs.

m) Se cargaron aproximadamente 700 μL en un filtro spin y se centrifugaron a 10,000 x g por 1 min. Se descartó el filtrado y se agregó el sobrenadante restante al fitro de spin y se centrifugó nuevamente a 10,000 x g por 1 min. Nota: un total de dos cargas para cada muestra procesada son requeridas.

n) Se agregaron 300 μL de solución S4 y se centrifugó por 30 segs a 10,000 x g.

o) Se desechó el filtrado.

p) Se centrifugó nuevamente por 1 min.

q) Cuidadosamente se colocó el filtro de spin en un tubo nuevo y limpio. Se evitó salpicar solución S4 en el filtro.

r) Se agregaron 50 μL de Solución S5 (solución buffer estéril) al centro del filtro de membrana.

s) Se centrifugó por 30 segs.

t) Se desechó el filtro de spin. El ADN en el tubo está ahora listo para ser utilizado.

Se recomienda guardar el ADN a -20°C . La solución S5 no contiene Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA). Debido a que algunas muestras no amplificaron con las condiciones ya estandarizadas de PCR se procedió a reconcentrar el ADN de las mismas, siguiendo las indicaciones contenidas en el kit de extracción de ADN, de la siguiente manera:

4) Concentración del ADN

a) Materiales

- Solución de Cloruro de Sodio (NaCl) 5.0 M (0.2922 g de NaCl en 1 mL de H_2O totales).
- Etanol absoluto frío.

b) Procedimiento. Para un volumen final luego de la extracción de 50 μL .

- Se agregó 2.00 μL de solución 5.0 M de NaCl y se mezcló.
- Se agregó 100 μL de etanol absoluto frío y nuevamente se mezcló.

- Se centrifugó a 10,000 x g por 5 min.
- Se decantó cuidadosamente el sobrenadante.
- Se secó el etanol residual ya sea a temperatura ambiente o bien en una desecadora.
- Se resuspendió el ADN precipitado en 25 μ L de solución S5 del kit o bien se puede resuspender también en H₂Odd.

Debido a que el procedimiento de reconcentración no funcionó para todas las muestras que no amplificaron, se aplicó el siguiente protocolo de extracción de ADN esperando obtener resultados más satisfactorios:

b. Protocolo de extracción de ADN de *Plasmodium* en muestras de sangre en papel filtro con Chelex⁹ (Cheleting Resin (Iminodiacetic Acid)). Protocolo aplicado para la extracción de ADN de *B. thuringiensis*.

1) Materiales

- Solución de Chelex al 5% (0.05 g de Chelex (Cheleting Resin (Iminodiacetic Acid) en 1 mL de H₂Odd totales)
- Solución S5 (Buffer de elución, solución acuosa de Tris(hidroximetil) aminometano/ ácido hidrociorhídrico)

2) Procedimiento

- a) Se diluyó 1 asada de la colonia de la cual se desea extraer el ADN en 25 μ L de H₂Odd y mezcló con vortex para homogenizar la dilución.
- b) A esos 25 μ L de dilución se le agregaron 100 μ L de solución de Chelex al 5% y se hirvieron en baño maría por 5 min.
- c) Se agitaron con Vortex por 30 segs.
- d) Se hirvieron por 5 min más y se centrifugaron a 12,000 x g por 2 min.
- e) Se removió el sobrenadante.

⁹ Chelex está compuesto de copolímeros de estireno divinilbenceno que contienen iones de iminodiacetato que actúan como grupos quelantes al unirse a iones metálicos polivalentes tales como el magnesio. Al remover el magnesio de la reacción, las enzimas que destruyen el ADN conocidas como nucleadas son inactivadas y las moléculas de ADN son protegidas (Butler, 2005).

f) Se reconcentró a 25 μ L y utilizando la solución S5 del kit de extracción para su resuspensión¹⁰.

2. Almacenamiento del ADN. El ADN fue eluido en la solución S5 (Tris 10 mM) por lo tanto se guardó a -20°C o podría degradarse.

3. Selección de Iniciadores o primers (ver ANEXO)

4. Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Solo se realizó PCR a las muestras cristal positivo.

a. Se limpió con etanol (EtOH) al 70% toda la campana de flujo laminar y se colocó dentro de la misma: descarte de puntas, pipetas, puntas y tubos Eppendorf (si lo requiere una mini centrifuga y un vortex), seguidamente se encendió la lámpara de UV de la campana por 15-20 min.

b. Terminado ese tiempo, se llevaron todos los materiales para el PCR (excepto la *Taq* polimerasa, las muestras y los controles) en un bloque frío a la campana.

c. Se hizo la mezcla matriz o master mix en tubos Eppendorf adecuados a la cantidad total de muestras que vaya a preparar dependiendo del volumen total escogido (10 μ L de reacción). Se agregaron los reactivos en el orden y cantidad especificada de acuerdo al cuadro 6.

Cuadro 6: Orden y reactivos para PCR.

Orden	Reactivo	Conc. final	10 μ L
1	ddH ₂ O		6.08
2	INVITROGEN 10 X Buffer	1 X	1
3	MgCl ₂ (50 mM)	2.5 mM	0.5
4	dNTP's	0.2 mM ea	0.8
5	Primer Mix (50F y 222R) (20 pmol/ μ L ea)	1.2 pmol/ μ L ea	0.6
6	<i>Taq</i> (Invitrogen)	0.01 μ L	0.02
7	ADN muestra		1
	Vol total		10 μ L

*en el paso 5, asegurarse de mezclar con vortex para luego agregar la *Taq* polimerasa y mezclar.

d. Una vez hecha la mezcla matriz o master mix, los reactivos utilizados para ésta fueron devueltos al congelador a -20°C.

¹⁰ Comunicación oral Lda. Renata Mendizábal de Cabrera, Laboratorio de Malaria, Insitituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala (UVG) y obtenido a partir de la página: Oldroyd, B.; S. Lapidge y R. Mackay-Wood. Pedigree Analysis. School of Biological Sciences, University of Sydney. Australia. visitada: 26/02/08. página web: <http://bugs.usyd.edu.au/DNA/DNAextrn.html>

e. Se llevó entonces a la campana la *Taq* polimerasa y se agregó a la mezcla matriz o master mix en la cantidad adecuada, luego de ser utilizada se devolvió al congelador a -20°C .

f. Mezclando bien, se hicieron alícuotas de $9\ \mu\text{L}$ de la mezcla matriz o master mix en la cantidad adecuada de tubos eppendorf de $0.2\ \text{mL}$, de acuerdo a la cantidad de muestras que se tenían.

g. Se realizó el control negativo, agregando al tubo marcado para el mismo $1\ \mu\text{L}$ de la misma H_2O para PCR que utilizó en la mezcla matriz o master mix. Se agregó una gota de aceite mineral y se cerró el tubo (todo esto para evitar la contaminación del mismo).

h. Se llevaron las muestras a la campana en un bloque frío y se centrifugaron brevemente. Se agregó $1\ \mu\text{L}$ de la muestra a cada tubo de $0.2\ \text{mL}$ de pared delgada para PCR. Luego de agregar la muestra se agregó una gota de aceite mineral y se cerraron los tubos.

i. Se regresaron las muestras al congelador a -20°C y se sacaron la(s) muestra(s) de control(es) positivo(s) que se utilizaron y se colocó igualmente $1\ \mu\text{L}$ de la misma en el tubo para PCR. Se agregó una gota de aceite mineral y se cerraron el(los) tubo (s).

j. Se centrifugaron brevemente los tubos para asegurar que el contenido de los mismos se encuentra en el fondo y se colocaron en el termociclador NYX TECHNIK ATC 201 utilizando el programa 16S_BT, descrito en el cuadro 7.

Cuadro 7: Programa para PCR de 16S ADNr

Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Función	Tiempo	Ciclos
94	Desnaturalización inicial	3 min	
94	Desnaturalización	30 s	} 30
49	Annealing	30 s	
72	Elongación	1 min 30 s	
72	Elongación final	10 min	

k. Luego que el termociclador terminó de correr las muestras, éstas se verificaron por medio de electroforesis con gel de agarosa al 2%, Figura 15; que las muestras fueron amplificadas por los iniciadores o primers usados (esta verificación se realizó solamente para el primer PCR, para el cual se utilizaron como muestras los controles positivos para optimizar la técnica).

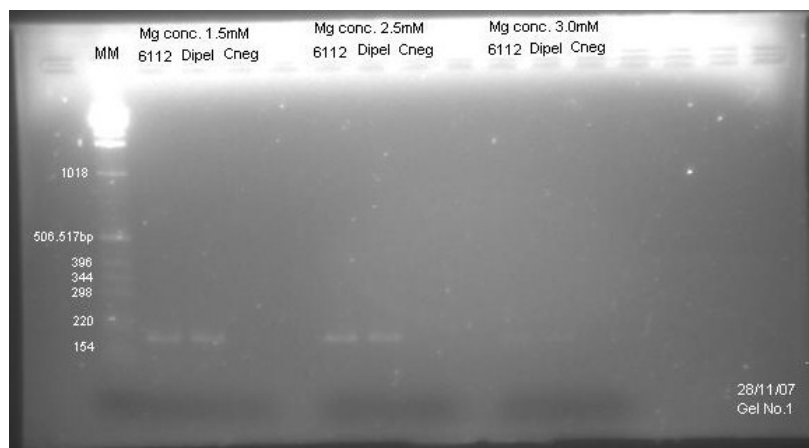


Figura 15: Verificación de la ampliación de los productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores o primers 50F y 222R, utilizando el control de Dipel® y la cepa control 6112 de *B. thuringiensis*. Se observa un producto de ampliación de entre 220-154 pb (pares de bases) aproximadamente.

1. Una vez termina el termociclador y antes de almacenar a -20°C , se prepararon las muestras de ADN para su desnaturalización (Conformación de Hebra Única)

5. Desnaturalización de las muestras de ADN

a. Buffer de montaje (buffer de desnaturalización 6X (glicerol 40%))

1) Materiales. Para 5 mL de buffer:

- 0.6 mL de EDTA 0.5 M (conc final 0.06 M)
- 2 mL de glicerol 100% (conc final 40%)
- 0.025 g de azul de bromofenol

Se aforó a 5 mL usando H_2O dd y se mezcló con vortex. Se almacenó a 4°C y se hicieron 5 alícuotas de 1 mL que se almacenaron debidamente etiquetadas a -20°C .

2) Procedimiento

a) A $10\ \mu\text{L}$ de producto de PCR se le agregaron $2.00\ \mu\text{L}$ de buffer 6X (glicerol 40%) bajo campana.

b) Se desnaturalizaron las muestras a 95°C por 5 min utilizando el programa KLENTAMIENTO_BT, en el termociclador NYX TECHNIK ATC 201 luego se dejaron 1 hora a temperatura ambiente para que se renaturalizaran.

c) Se montaron en el gel 1.5 μL , de la mezcla anterior de la muestra y el buffer, cuidando de no contaminar otros los pozos. Se montaron 1.00 μL de marcador molecular, en este caso se utilizó 1 Kb ladder de INVITROGEN[®] a una dilución de 1:80 (0.5 μL de 1 Kb ladder, 39.5 μL de H_2O y 10.00 μL de buffer de montaje).

d) Una vez ya montado en el gel se corrieron las muestras

e) Se almacenaron los tubos con las muestras ya renaturalizadas a -20°C¹¹.

6. Protocolo para el polimorfismo conformacional de hebra única (SSCP) y electroforesis con gel no desnaturizante de poliacrilamida (PAGE)

a. Preparación y tratamiento de las placas de vidrio (unnotched):

1) Procedimiento. Use guantes.

a) Esta placa se raspaba con un limpiador de plástico abrasivo (verde) y una pequeña cantidad de Alconox. Se dejaba en la placa durante 1 ó 2 minutos. Se lavaba con agua destilada/desmineralizada en los dos lados de la placa. Las placas se secaban con paños que no dejaran mota o eran dejadas que se secaran al aire.

b) La placa se lavaba con etanol al 95% (EtOH) y se limpiaba con servilletas de papel limpias (Kimwipes).

c) Para resultados óptimos se limpiaba además con metanol absoluto frío y se secaba con servilletas de papel limpias (Kimwipes)¹².

b. Preparación y tratamiento de la placa de vidrio opuesta (notched):

1) Procedimiento

a) Se cambiaron los guantes.

b) La placa se lavó con una esponja suave y alconox, y se enjuagó con agua con agua destilada.

c) La placa se lavó con EtOH al 95% y secó con una servilleta limpia.

¹¹ Soto, D. y S. Sukumar. 1992. Improved Detection of Mutations in the p53 Gene in Human Tumors as Single-stranded Conformation Polymorphs and Double-stranded Heteroduplex DNA. PCR Methods Appl. 2: 96-98 pp.

¹² Esta modificación se da después de una comunicación oral con la Lda. Renata Mendizábal de Cabrera.

4. Para resultados óptimos se limpió además con metanol absoluto frío y con servilletas de papel limpias (Kimwipes).

5. Se colocan las placas juntas con los espaciadores en medio de ellas. Se revisó que los espaciadores y las placas estén bien alineados.

c. Electroforesis con gel no desnaturizante de poliacrilamida (PAGE)

1) Preparación del gel de acrilamida¹³ al 12% (se preparan 10 mL para dos geles de 4 mL cada uno). Notar que en este sistema no es necesario dejar pegado el gel en la placa de vidrio, y que el grosor del gel es de 0.75 mm.

a) Materiales. Todo esto para un volumen total de 10 mL.

- 3.12 mL solución stock de acrilamida 38.5% (187.5g de acrilamida y 5.0 g de bisacrilamida en 500 mL de H₂O totales)
- 0.5 mL de TBE 10X (conc final 0.5X) (108.0 g de Tris Base, 55.0 g de Ácido Bórico, 40 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0) en 1000 mL de H₂O totales)
- 0.5 mL de Glicerol (conc final 5%)
- 5.88 mL de H₂O
- 10 µL de N, N, N, N- Tetrametil-Etilendiamina (TEMED)
- 40 µL Persulfato de Amonio (APS) al 25% p/v (62.5 mg en 250 µL de H₂O)

b) Procedimiento

- Se preparó la solución stock de acrilamida, y se almacenó en el refrigerador (2-4°C) en una botella de vidrio de color ámbar o bien en una botella de vidrio forrada con papel aluminio debidamente etiquetada.
- Se alicuotó la cantidad de solución stock (previamente preparada) adecuada para la cantidad de geles a preparar.
- A esta alícuota de solución stock de acrilamida, se le agregó la cantidad adecuada de buffer TBE 10X, la cantidad adecuada de glicerol y se aforó con H₂O.
- Se filtró al vacío y desgasificó por 20 min.

¹³ Tomado originalmente de: Black, B. SSCP en Minigeles (BIORAD). Colorado State University, Estados Unidos. 6 de Julio 1998. Protocolo aplicado en el laboratorio de Chagas, Universidad del Valle de Guatemala y se modifica el porcentaje de acrilamida de los geles, como parte de su optimización, después de una comunicación oral con la Lda. Renata Mendizábal de Cabrera.

- Luego de esto se agregó en este orden, la cantidad adecuada de TEMED y de APS.

- Se sirvió con pipeta en las placas de vidrio ya preparadas, y se colocaron los peines con la cantidad de pozos adecuada a la cantidad de muestras y se espera 1 h para la gelificación.

- Una vez ya listos, si se van a utilizar en el momento se colocarán en la cámara de electroforesis o bien pueden almacenarse (2-4°C) en buffer TBE 0.5X (duración aproximada de 1 mes).

2) Corrida del gel

a) Procedimiento

- Se utilizó una corriente de 8-10 mA, para 2 geles con voltaje máximo usando TBE 0.5X. Aproximadamente se tardan 1 ½ h en correr.

3) Tinción del gel con plata. Método para teñir dos geles juntos. La pureza del agua es crítica para esta tinción, sobre todo que no contenga iones, se recomienda agua H₂O_{dd} autoclaveada.

a) Materiales. Para tinción y revelado de dos geles:

- Solución de Revelado o Sol. Ácido acético (HAc) al 10% (20 mL de ácido acético en 200 mL de H₂O_{dd} totales).

- Solución de Nitrato de Plata¹⁴ (AgNO₃) 0.10% y 0.15% Formaldehído al 37% (0.15 g de AgNO₃ y 225 µL de formaldehído al 37% en 150 mL de H₂O_{dd} totales, la solución debe prepararse fresca y almacenarse en la oscuridad).

- Solución de Carbonato de Sodio¹⁵ con 0.15% de formaldehído al 37% y tiosulfato de sodio (4.50 g de NaCO₃, 225 µL de formaldehído al 37% y 1.5 µL de solución de tiosulfato de sodio (0.225 g de tiosulfato de sodio en 500 µL de H₂O_{dd} totales))

¹⁴ Esta solución DEBE realizarse 2 a 4 min antes de que termine el periodo de incubación con la solución reveladora de ácido acético al 10%.

¹⁵ Esta solución DEBE realizarse 2 min antes de que termine el periodo de incubación con la solución de nitrato de plata, con agua fría (2°C) en una botella fría (2°C).

b) Procedimiento

1. Se remojó agitando los dos geles juntos en 200 mL de ácido acético (HAc) al 10% por 30 min (se pueden dejar indefinidamente en esta solución, guardar esta solución para el revelado).
2. Se lavaron 4 veces los geles agitando, 2 min/ lavado, con 250 mL de H₂Odd/ lavado.
3. Se incubaron agitando por 30 min en 150 mL de solución con AgNO₃ 0.10% y 0.15% de formaldehído al 37%.
4. Se lavaron agitando por 15 segs en 250 mL de H₂Odd.
5. Se incubaron agitando en 150 mL de sol fría (aprox 10°C) de carbonato de sodio al 3% con formaldehído al 0.15% y 1.5 µL de una solución 0.225 g de tiosulfato de sodio/ 0.5 mL, notar que estos dos últimos se agregan inmediatamente antes de usar la solución). Las bandas de ADN aparecen en pocos minutos.
6. Se detiene el revelado con solución de HAc al 10%.

4) Secado del gel

a) Equipo. Gel Dryer 543 model, BIORAD

b) Materiales


- Papel Filtro¹⁶
- Papel Celofán
- Solución para Secado de Gel¹⁷ (3 mL de glicerol, 40 mL de metanol y 10 mL de ácido acético en 100 mL de H₂Odd totales)

c) Procedimiento. Para geles de poliacrilamida menores del 15%.

- Se cortó un pedazo de papel filtro cuyo tamaño sea un poco mayor al gel y se remojó en agua destilada. Se escurrió brevemente y se colocó sobre la base de papel filtro grueso que se encuentra sobre el soporte poroso del aparato.

¹⁶ como alternativas en caso no se cuente con este tipo de papel se puede utilizar: cartulina blanca o bien papel cansson.

¹⁷ Es importante notar que esta solución tiene una vida media de 15-17 días, después de ese tiempo los resultados no son óptimos y se ha encontrado que los geles tienen a fracturarse durante o inmediatamente después del secado. ESTA SOLUCIÓN DEBE MANTENERSE A 2°C.

- Se colocó el gel sobre el papel filtro y suavemente se desliza un trozo de acetato sobre él para eliminar las burbujas que pudieran quedar atrapadas entre el gel y el papel filtro.
- Se cortó una membrana de celofán del mismo tamaño que el papel filtro, se remojó en la solución para secado de gel y se cubre con ella el gel. Se remueven nuevamente las burbujas con el acetato.
- Se cubrió con el cobertor plástico, se cerró la tapadera y se encendió el vacío.
- Se seleccionó el ciclo , con una temperatura entre 60 y 80°C de temperatura por 1-2 hrs (se dan variaciones y esos son los rangos adecuados de tiempo y temperatura que se encontraron).
- Cuando se haya completado el tiempo, se abrió la tapadera del aparato y se dejó enfriar el sistema hasta que el cobertor plástico estaba totalmente frío. Luego se apagó el vacío y se removió el gel¹⁸.

C. Diseño del Estudio

Este trabajo consistió en una investigación no experimental de tipo transversal descriptiva, es un estudio en donde no se hacen cambiar en forma intencional las variables independientes para determinar su efecto sobre otras variables. Se recolectaron datos en un solo momento, en un tiempo único. Su propósito fue describir variables y analizar su recurrencia o interrelación en un momento dado. Su objetivo principal es indagar la incidencia de las modalidades o niveles de una o más variables en una población. Por lo tanto es un estudio puramente descriptivo y la hipótesis del mismo también lo es (Hernández *et al.*, 2006).

El propósito de este estudio fue describir en este caso la cantidad de mutaciones puntuales encontradas que diferían de las bandas de los dos controles positivos utilizados, en los aislados de muestras de suelo, hojarasca y follaje de ambas fincas. Estas bandas difieren en los patrones de las bandas de ADN, usando a las cepas: Dipel[®] (*Bacillus thuringiensis* Berliner var *kurstaki* (BST-88, Agrícola El Sol) y 6106 *Bacillus thuringiensis* serovar sotto, serovar (4a4b) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ); como control de amplificación y como referencia para los patrones.

¹⁸ Manual del Gel Dryer 543 model, BIORAD

Debido a la cantidad de muestras a analizar (alrededor de 30 muestras por cada una de las fincas) se podrán inferir los resultados obtenidos a otras zonas geográficas con este tipo de cultivo. En la parte microbiológica se describieron los microorganismos aislados y en la parte molecular se describieron las diferencias encontradas en cuanto a la cantidad de mutaciones puntuales representadas en bandas, presentadas por cada uno de los aislados que difieran de los controles positivos a utilizar.

D. Análisis estadístico

a. Análisis de datos microbiológicos. Para el análisis de los datos obtenidos luego de la tinción de cristales con azul de Coomassie se utiliza:

1) Proporciones binomiales. Muchas variables en la investigación son binarias, teniendo dos posibles valores. Cuando una variable binaria es adjuntada para cada individuo o unidad en una muestra, usualmente se reporta la proporción que cae en un grupo particular, casi siempre expresado como un porcentaje (Newcombe, 2000).

2) Intervalos de confianza. Se ha formulado una variedad de métodos alternativos, pero el más recomendado es el método debido a Wilson (1927), conocido como el método de puntuación o “score method”, que tiene muy buenas propiedades para cualquier tipo de datos y es razonablemente fácil de calcular. Entonces de acuerdo al método de Wilson, esto se hace de la siguiente manera:

Suponga que de n individuos o unidades, r son positivos para la característica de interés y z es 1.96 para un intervalo de confianza del 95%. Entonces la proporción de respuestas positivas está dado por, p :

$$p = \left(\frac{r}{n} \right)$$

Para calcular el intervalo de confianza correspondiente a la proporción en la población de donde la muestra se tomó, se deben calcular primero tres cantidades (Newcombe, 2000),

$$A = 2r + z^2$$

$$B = z \sqrt{z^2 + 4r \left(1 - \left(\frac{r}{n} \right) \right)}$$

$$C = 2(n + z^2)$$

Luego, el intervalo de confianza para la proporción está dado por (Newcombe, 2000),

$$\left[\left(\frac{A-B}{C} \right), \left(\frac{A+B}{C} \right) \right]$$

b. Análisis de datos moleculares. Para el análisis de los resultados obtenidos a partir de la técnica de SSCP se utiliza:

1) Medición de la diversidad genética. La discriminación de organismos en base de variables fenotípicas o marcadores genéticos es todavía el pilar de la ecología cuantitativa microbiológica y de la epidemiología descriptiva. Para determinar la diversidad de microorganismos en ambientes (ecosistemas) definidos o para identificar el éxito reproductivo de organismos que causan enfermedades, i.e., la distribución de cepas particulares entre huéspedes, las técnicas para la tipificación genética están posicionándose porque tienen la habilidad de distinguir los diversos organismos de la misma especie (Grundmann *et al.*, 2001).

La diversidad biológica puede ser cuantificada de muchas formas diferentes. Existen dos factores principales que se toman en cuenta cuando se mide la diversidad, la riqueza y la uniformidad o balance. La riqueza es una medida del número de diferentes especies presentes. Sin embargo, la diversidad depende no solo de la riqueza, sino también de la uniformidad. La uniformidad compara la similitud del tamaño de la población de las especies presentes (Grundmann *et al.*, 2001).

a) Conceptos

1) Riqueza. El número de especies por muestra es una medida de la riqueza. Mientras más especies estén presentes en una muestra más rica será. La riqueza de especies es una medida que no toma en cuenta el número de individuos de cada especie presentes. Le da tanto

peso a las especies que tienen pocos individuos así como aquellas que tienen muchos individuos (Grundmann *et al.*, 2001).

2) Uniformidad. La uniformidad es una medida de la abundancia relativa de las diferentes especies que componen la riqueza de un área (Grundmann *et al.*, 2001).

3) Índice de Simpson (D). Es una medida de la probabilidad que dos individuos al azar seleccionados de una muestra pertenezcan a la misma especie (o alguna otra categoría diferente de especie). Para esto los índices de diversidad han sido definidos matemáticamente basándose en la frecuencia en la cual los organismos de un tipo particular ocurren en una población o pueden ser discriminados por una herramienta para tipificación adecuada. Los individuos de una población pertenecerán a uno de los Z tipos y ocurrirá con frecuencias de (Grundmann *et al.*, 2001):

$$\pi_1 \dots \pi_Z, \text{ tal que } \Sigma\pi = 1$$

Para microorganismos que usualmente tienen una gran población, la diversidad genética (λ) puede ser descrita como (Grundmann *et al.*, 2001):

$$\lambda = 1 - \Sigma\pi^2$$

Que será luego la probabilidad que dos individuos escogidos al azar sean de diferente tipo. El cálculo de D para un población finita esta dado como (Grundmann *et al.*, 2001):

$$D = \left(\frac{\Sigma n(n-1)}{N(N-1)} \right)$$

El valor de D está entre 0 y 1. Con este índice, 0 representa una diversidad infinita y 1, que no hay diversidad. Esto es, que al tener un mayor valor de D, hay una menor diversidad. Si a 1 se le resta D, se obtiene entonces el índice de diversidad de Simpson (Grundmann *et al.*, 2001).

D es un estimado de la verdadera diversidad λ de una población basado en una muestra de n individuos. Solo por azar, diferentes muestras darán diferentes resultados, la diferencia está debida a una variación en la muestra y al tomar muestras repetidas, la precisión de la media estimada para D mejorará. Si muestra repetidas de un tamaño fijo n son tomadas de la muestra de población, los valores de D serán distribuidos de acuerdo a λ con la varianza σ^2 (Grundmann *et al.*, 2001):

$$\sigma^2 = \left(\frac{4}{n}\right) \left[\sum \pi_j^3 - \left(\sum \pi_j^2\right)^2 \right]$$

Donde π_j es la frecuencia n_j/n , n_j es el número de cepas pertenecientes al j vo tipo, y n es el número total de cepas en la población muestra. Un estimado de la desviación estándar de λ está dado por la raíz cuadrada de σ^2 , y el intervalo de confianza (CI) al 95% se obtiene (Grundmann *et al.*, 2001):

$$CI = \left[D - 2\sqrt{\sigma^2}, D + 2\sqrt{\sigma^2} \right]$$

4) Índice de diversidad de Simpson ($1 - D$). Es una medida de la diversidad. En ecología, es utilizado para la cuantificación de la biodiversidad de un hábitat. Toma en cuenta las especies presentes, así como la abundancia de cada especie (Grundmann *et al.*, 2001). El valor de este índice esta en un rango de 0 a 1, pero ahora, a mayor valor, mayor diversidad hay en la muestra. Esto tiene sentido ya que el índice representa la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar de una muestra pertenezcan a diferentes especies (Grundmann *et al.*, 2001).

b) Almacenamiento de datos. Los datos fueron almacenados y analizados por medio del programa Excel perteneciente al paquete de Windows office 2003.

VIII. RESULTADOS

El estudio se dividió en dos fases, la primera comprendió el aislamiento de *B. thuringiensis*¹⁹ de tres tipos de muestras diferentes: hojarasca, follaje y suelo de árboles de aguacate Hass provenientes de dos fincas ubicadas en dos regiones de Guatemala diferentes. La segunda fase consistió en la extracción del ADN de los aislados y el análisis de éstos por medio de la técnica molecular SSCP para la detección de sus mutaciones puntuales. Además del análisis estadístico de las variantes genéticas encontradas por medio del índice de Simpson.

Durante la primera fase, luego del aislamiento de las bacterias se procedió a la caracterización fenotípica de las mismas por medio de las características de las colonias y la realización de dos tipos de frotos. Se clasificaron los aislamientos como Gram positivo o negativo, el frote con azul de Coomassie se utilizó para la visualización de los cristales proteicos producidos por la bacteria y se tomó como prueba positiva de identificación del aislamiento.


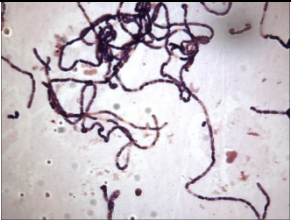
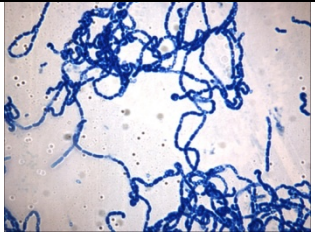

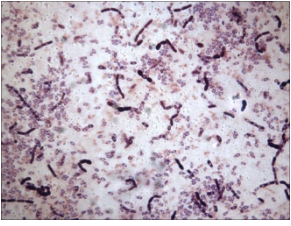
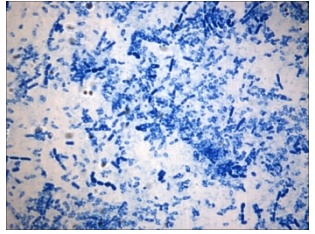
El análisis estadístico de esta sección se realizó utilizando proporciones binomiales para las cepas cristal positivo. En la segunda fase se optimizó el protocolo de PCR para la amplificación del gen de la región 16S del ADN ribosomal; además de la optimización del protocolo de la técnica molecular de SSCP para la visualización de las mutaciones puntuales en esta región. En esta segunda fase se realizó el análisis estadístico de las muestras midiendo la diversidad biológica de las muestras por medio del índice de Simpson.

A. Resultados del aislamiento e identificación a nivel microbiológico de *B. thuringiensis*

1. Primer muestreo. Se analizaron 30 muestras 10 de cada uno de los tres tipos: suelo, hojarasca y follaje, provenientes de la primera finca ubicada en la aldea Sta. Ana, del Municipio de Antigua Guatemala, Sacatepéquez, para un total de 150 aislamientos. Luego de aisladas las bacterias se prepararon dos frotos por cada colonia y todas las tinciones de Gram resultaron positivas. La colonia y el frote se observaron como se muestra en el Cuadro 8:

¹⁹ Se hace la salvedad que, en este estudio se define como *B. thuringiensis* a, aquellos aislados que presenten luego de la prueba de tinción con azul de Coomassie, cristal positivo además de que la morfología de sus colonias coincida con la descrita en los antecedentes.

Cuadro 8: Fotos de colonias con frote de Gram y azul de Coomassie primer muestreo.

Muestra	Colonia (número)	Morfología de la colonia	Morfología con tinción Gram	Morfología con tinción con azul de Coomassie
1S1	1	 <p>Color: Blanca. Apariencia: Mucoide, lisa. Borde: Lobulado. Elevación: Plana.</p>	 <p>+</p>	 <p>-</p>
	2	 <p>Color: Blanca. Apariencia: Mucoide, lisa. Borde: Ondulado. Elevación: Umbilicada.</p>	 <p>+</p>	 <p>+</p>

Las muestras se codificaron de la siguiente manera:

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

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

Entonces por ejemplo, si la muestra se llamara 1S12, sería la muestra 1 de suelo del primer muestreo y de la colonia 2.

El diagnóstico microbiológico positivo para la tinción con azul de Coomassie fue la única prueba confirmativa para *B. thuringiensis*. El resultado de la tinción de Gram se utilizó sólo para la clasificación, puesto que de acuerdo a la literatura puesto que *B. thuringiensis* es un bacilo Gram positivo y la descripción de la colonia: circular, blancas, planas, onduladas o enteras para las colonias cristal positivo correspondió a esta descripción. Los resultados obtenidos para la coloración con azul de Coomassie se muestran en el Cuadro 9:

Cuadro 9: Resultados obtenidos con la tinción de azul de Coomassie del primer muestreo.


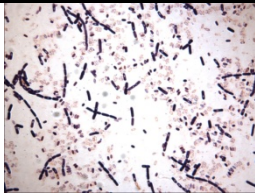
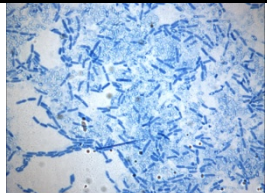


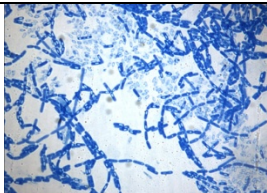
Muestra		Colonia					
		1	2	3	4	5	
Hojarasca	1	+	+	+	+	-	Total 30
	2	+	+	+	+	+	
	3	+	-	-	-	+	
	4	+	+	+	-	+	
	5	+	+	+	+	+	
	6	+	-	-	+	+	
	7	-	-	-	-	-	
	8	+	-	+	-	+	
	9	-	+	+	+	-	
	10	-	-	+	-	-	
Follaje	1	+	+	-	+	+	Total 49
	2	+	+	+	+	+	
	3	+	+	+	+	+	
	4	+	+	+	+	+	
	5	+	+	+	+	+	
	6	+	+	+	+	+	
	7	+	+	+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

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

Para efectos de este estudio se sometió a la segunda fase del estudio solamente las colonias cristal positivo. Luego del tamizaje por la coloración de azul de Coomassie se cuantificaron 98 positivos de 150 aislados.

2. Segundo muestreo. Se analizaron 30 muestras 10 de cada uno de los tres tipos: suelo, hojarasca y follaje, provenientes de la finca “Don Bosco” ubicada en Tac tic, Alta Verapaz, para un total de 146 aislamientos. Luego de aisladas las bacterias se prepararon dos frotos por cada colonia y todas las tinciones de Gram resultaron positivas. La colonia y el frote se observaron como se muestra en el Cuadro 10:

Cuadro 10: Fotos de colonias con frote de Gram y azul de Coomassie del segundo muestreo

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

Las muestras se codificaron de la siguiente manera:

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

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

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

El diagnóstico microbiológico positivo para la tinción con azul de Coomassie fue la única prueba confirmativa para *B. thuringiensis*. El resultado de la tinción de Gram se utilizó sólo para su clasificación puesto que *B. thuringiensis* es un bacilo Gram positivo y la descripción de la colonia: circular, blancas, planas, onduladas o enteras para las colonias cristal positivo correspondió a lo establecido en la literatura. Los resultados obtenidos para la coloración con azul de Coomassie se muestran en el Cuadro 11:

Cuadro 11: Resultados obtenidos con la tinción de azul de Coomassie del segundo muestreo

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

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

Para efectos de este estudio se sometió a la segunda fase del estudio solamente las colonias cristal positivo. Luego del tamizaje por la coloración de azul de Coomassie se cuantificaron 73 positivos de 146 aislados. Se obtuvieron entonces 171 aislamientos positivos de 296 muestras analizadas, de esta primera fase.

B. Resultados de la identificación a nivel molecular de las mutaciones puntuales en la región 16S del ADN ribosomal de *B. thuringiensis*

Se realizó la optimización del protocolo molecular de las técnicas de PCR y de polimorfismo conformacional de hebra única (SSCP) para la amplificación del gen 16S del ADN ribosomal; para el SSCP se partió de un protocolo inicial desarrollado por el Dr. Black en la Colorado State University, Estados Unidos (datos no publicados), el cual fue modificado para obtener resultados óptimos.

Se realizaron las modificaciones detalladas en la metodología, las cuales corresponden principalmente a: el uso de calentamiento para la desnaturalización de las muestras así como la adopción del buffer de montaje utilizado, un cambio en la concentración de los geles de poliacrilamida, el voltaje de la corrida y el tiempo. Además de las modificaciones a la técnica de SSCP, se modificó el protocolo de PCR utilizado, cambiando: la concentración de magnesio y utilizando el ADN de la muestra puro en vez de diluirlo.

Se utilizaron también dos protocolos para la extracción del ADN de las muestras, primero se probó con el protocolo de extracción propuesto en el kit y las muestras que no amplificaron fueron reconcentradas utilizando el procedimiento propuesto en el mismo. Puesto que una gran cantidad de muestras tampoco amplificó entonces se utilizó el protocolo para extracción de ADN de *Plasmodium* adaptado para *B. thuringiensis* y luego de utilizarlo quedaron sin amplificar solamente 7 muestras de 171 positivos analizados. La Figura 16 muestra los resultados de la optimización de la técnica de SSCP para la región 16S del ADN ribosomal.

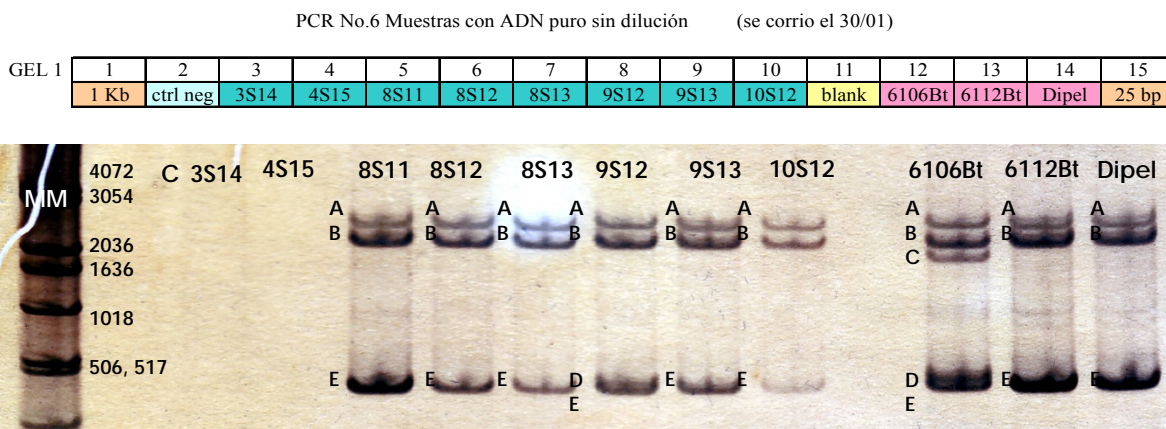


Figura 16: Visualización de las mutaciones puntuales de la región 16S del ADN ribosomal de *B. thuringiensis*, luego de la optimización del protocolo de la técnica de SSCP. MM) marcador molecular 1Kb INVITROGEN; C) control negativo; Muestras: 3S14, 4S15, 8S11, 8S12, 8S13, 9S12, 9S13 y 10S12; Controles positivos: 6106 *Bacillus thuringiensis* serovar sotto, serovar (4a4b) (DSMZ); 6112 *Bacillus thuringiensis* serovar morrisoni serovar (8a8b) (DSMZ) y Dipel®: *Bacillus thuringiensis* Berliner var *kurstaki* (BST-88, Agrícola El Sol).

Los cuadros 12-17 muestran los perfiles de las mutaciones puntuales de muestras de: suelo, follaje y hojarasca tanto del primer como del segundo muestreo en la región 16S del ADN ribosomal. Por medio de SSCP a 164 aislados de 171 positivos, estos equivalen a todas las muestras que amplificaron luego de utilizar cualquiera de los dos protocolos de extracción de ADN. Las bandas fueron clasificadas utilizando la escalera de 1 Kb marca INVITROGEN como una comparación para la clasificación, ya no que fue utilizada para comparar cantidad de pares de

base de la banda; esto debido a que el producto de amplificación del PCR esperado (según visto en la metodología) se encontraba dentro en un rango de 220-154 pb pero debido a que se utiliza la técnica de SSCP el marcador molecular no cumple su función por ello solo se usa como referencia.

Esto se debe a que para la técnica de SSCP, luego de la desnaturalización se deja que el ADN se renaturalice y, puede que, al enrollarse sobre si mismo tome cualquier conformación debido a que las condiciones de la renaturalización no son astringentes o específicas (según visto en antecedentes). Es posible observar fragmentos con una mayor cantidad de pares de bases, pero esto es aparente ya que en este caso una conformación diferente podría tener una mayor dificultad para migrar que otras pudiendo tomarse como una mayor cantidad de pares de bases cuando no es así.

Cuadro 12: Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de suelo del primer sustrato en la región 16S del ADN ribosomal.

Muestra	ID	Bandas				
		A	B	C	D	E
Control	Dipel	x	x			x
positivo	6106	x	x	x	x	x
Suelo	1S12	x	x			x
	1S14	x	x			x
	2S15	x	x			x
	3S11	x	x			x
	3S12	x	x	x		x
	3S14	x	x			x
	4S12	x	x			x
	4S13	x	x			x
	4S15	x	x			x
	6S12	x	x			x
	6S13	x	x			x
	6S14	x	x	x	x	x
	6S15	x	x			x
	7S12	x	x			x
	8S11	x	x			x
	8S12	x	x			x
	8S13	x	x			x
	9S12	x	x		x	x
10S12	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.

Cuadro 13: Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de hojarasca del primer muestro en la región 16S del ADN ribosomal.

Muestra	ID	Bandas					
		A0	A	B	C	D	E
Control positivo	Dipel 6106		x	x	x	x	x
Hojarasca	1H11		x	x			x
	1H12		x	x	x	x	x
	1H13	x	x	x	x	x	x
	1H14		x	x			x
	2H11		x	x			x
	2H12		x	x	x	x	x
	2H13		x	x	x	x	x
	2H14		x	x	x	x	x
	2H15		x	x			x
	3H11		x	x	x		x
	3H15		x	x	x		x
	4H11		x	x	x		x
	4H12		x	x	x		x
	4H13		x	x	x		x
	4H15		x	x	x		x
	5H11		x	x	x		x
	5H12		x	x	x		x
	5H13		x	x	x		x
	5H14		x	x			x
	5H15	x	x	x			x
	6H11	x	x	x			x
	6H14	x	x	x			x
	6H15	x	x	x			x
	8H11		x	x			x
	8H13		x	x			x
	8H15	x	x	x			x
	9H12			x			x
	9H13			x			x
	9H14			x			x
	10H13			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, A = entre aprox 2036 y 3054 pb y A0 = 4072 pb.

Cuadro 14: Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de follaje del primer muestro en la región 16S del ADN ribosomal.

Muestra	ID	Bandas					
		A0	A	B	C	D	E
Control	Dipel		x	x			x
positivo	6106		x	x	x	x	x
Follaje	1F11			x			x
	1F12		x	x			x
	1F14		x	x			x
	1F15		x	x			x
	2F11		x	x			x
	2F12		x	x			x
	2F13		x	x			x
	2F14		x	x			x
	2F15		x	x			x
	3F11	x	x	x			x
	3F12	x	x	x			x
	3F13		x	x			x
	3F14		x	x			x
	3F15	x	x	x			x
	4F11	x	x	x			x
	4F12		x	x			x
	4F13	x	x	x			x
	4F14	x	x	x			x
	4F15		x	x			
	5F11		x	x			
	5F12		x	x			
	5F13		x	x			x
	5F14		x	x			x
	5F15		x	x			x
	6F11		x	x			x
	6F12		x	x			x
	6F13		x	x			
	6F14		x	x			x
	6F15		x	x			x
	7F11		x	x			x
	7F12		x	x			
	7F13		x	x			
	7F14		x	x			
	7F15		x	x			
	8F11		x	x			
	8F12		x	x			x
	8F13		x	x			x
	8F14		x	x			
	8F15						
	9F11		x	x			x
	9F12		x	x			x
	9F13		x	x			x
	9F14		x	x			x
	9F15		x	x	x		x
	10F11		x	x			
10F12							
10F13		x	x				
10F14		x	x			x	
10F15							

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, y A0 = 4072 pb.

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
Suelo	1S22						x	x	x	x			x
	2S22	x	x	x		x	x		x	x			x
	2S23								x	x	x	x	x
	2S24								x	x	x		x
	3S22								x	x			x
	3S23		x	x			x		x	x		x	x
	3S25								x	x	x		x
	4S21								x	x	x		x
	4S22								x	x	x		x
	4S23								x	x	x		x
	4S24								x	x	x		x
	4S25								x	x	x		x
	5S21								x	x		x	x
	5S22								x	x			x
	5S23								x	x	x		x
	6S23												
	6S24								x	x	x		x
	7S22								x	x	x		x
	7S24								x	x	x		x
	7S25								x	x	x		x
	8S21								x	x			x
	8S22					x	x	x	x	x			x
	8S23								x	x			x
	8S24								x	x			x
8S25								x	x			x	
9S21								x	x		x	x	
9S22								x	x			x	
9S23								x	x			x	
9S24								x	x			x	
10S21								x	x			x	
10S22								x	x			x	
10S23								x	x		x	x	
10S24								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.

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

Muestra	ID	Bandas					
		A0	A	B	C	D	E
Control positivo	Dipel 6106		x	x		x	x
Hojarasca	1H22		x	x			x
	1H23		x	x			x
	2H22		x	x			x
	4H23		x	x		x	x
	5H22	x	x	x			x
	6H22A		x	x			x
	8H24		x	x			x
	8H25		x	x			x
	9H21		x	x			x
	9H23		x	x			x
10H22			x	x	x	x	
10H25			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, y A0 = 4072 pb.

Cuadro 17: Perfiles de mutaciones puntuales de muestras de follaje del segundo muestro en la región 16S del ADN ribosomal.

Muestra	ID	Bandas				
		A	B	C	D	E
Control positivo	Dipel	x	x			x
	6106	x	x	x	x	x
	1F21	x	x			
	1F22					
	1F23	x	x		x	x
	1F24	x	x			x
	1F25					
	2F24	x	x			
	2F25	x	x			
	3F21	x	x			
	3F22	x	x			x
	3F23	x	x			x
	3F25	x	x			x
	4F21	x	x			x
	4F22	x	x		x	x
	4F23	x	x			x
Follaje	5F21	x	x			x
	5F22	x	x			x
	5F24	x	x			x
	5F25	x	x			x
	6F22	x	x		x	x
	6F23	x	x			x
	6F24	x	x			x
	6F25	x	x			x
	7F22	x	x			x
	7F23	x	x			x
	7F24	x	x			x
	7F25					
	9F22	x	x			x
	9F24	x	x			x
	9F25	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.

El cuadro 18 muestra los aislados analizados que mostraron un perfil de mutaciones puntuales diferentes del presentado por ambos controles positivos. En este cuadro se pueden observar que para el primer muestro se encontraron mutantes con los perfiles siguientes (tomando en cuenta todas las muestras): 10 mutantes con el perfil ECBA, 1 mutante con el perfil EDDBA, 1 mutante con el perfil EDCBAA0, 13 mutantes con perfil EBAA0, 1 mutante con perfil EB y 12 mutantes con perfil BA. Esto hace un total de 38 aislados con perfiles diferentes de los controles positivos de 98 aislados cristal positivo analizados.

Cuadro 18: Aislamientos con perfiles de bandas diferentes de los dos controles utilizados encontrados luego del análisis por medio de SSCP para muestras del primer muestreo.

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

El cuadro 19 muestra los aislados analizados que mostraron un perfil de mutaciones puntuales diferentes del presentado por ambos controles positivos. En este cuadro se pueden observar que para el segundo muestreo se encontraron mutantes con los perfiles siguientes (tomando en cuenta todas las muestras): 3 mutantes con perfil EBAA0A1, 1 mutante con perfil EBAA1A2A4A5A6, 12 mutantes con perfil ECBA, 10 mutantes con perfil BA, 1 mutante con perfil EDBAA2A4A5, 8 mutantes con perfil EDBA, 1 mutante con perfil EBAA0A1A2A3, 3 mutantes con perfil EBAA0A1 y 1 mutante con perfil EBAA0. Esto hace un total de 40 aislados con perfiles diferentes de los controles positivos de 73 aislados cristal positivo analizados.

Cuadro 19: Aislamientos con perfiles de bandas diferentes de los dos controles utilizados encontrados luego del análisis por medio de SSCP para muestras del segundo muestreo.

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

C. Resultados obtenidos del análisis estadístico

1. Análisis estadístico de los resultados obtenidos luego de la tinción con azul de Coomassie. Aplicando la proporción binomial y su intervalo de confianza al 95% respectivo, se obtuvo significativamente un mayor aislamiento de cepas cristal positivo (CP) en hojarasca y follaje en Antigua, comparado a los mismos nichos en Alta Verapaz, cuadros 20-21. El 60% (IC95%, 46-72%) de los aislados de la hojarasca de Antigua eran CP mientras que sólo el 26% (IC95%, 16-40%) de los aislados de la hojarasca en Alta Verapaz eran CP. Al comparar ambas regiones se puede notar que el suelo no difiere en la proporción de CP en ambas, esto debido a que ambos intervalos de confianza se intercalan.

Cuadro 20 Proporción binomial de muestras del primer muestreo, Antigua Guatemala

	Muestra	r	n	p	A	B	C	IC(inf)95%	IC(sup)95%	
Primer muestreo	Suelo	19	50	0.38	41.84	13.99	107.68	0.26	0.52	
	Hojarasca	30	50	0.6	63.84	14.11	107.68	0.46	0.72	
	Follaje*	49	50	0.98	101.84	5.46	107.68	0.90	1.00	
		Sn	150							

*Significativamente diferente a hojarasca y suelo con 95% de confianza

Dentro de la misma región de Antigua Guatemala se encontró que el follaje es significativamente diferente del suelo y la hojarasca de la misma región, con un 98% (IC95%, 90-100%), del 38% (IC95%, 26-52%) y 60% (IC95%, 46-72%) respectivamente.

Cuadro 21 Proporción binomial de muestras del segundo muestreo, Alta Verapaz

	Muestra	r	n	p	A	B	C	IC(inf)95%	IC(sup)95%	
Segundo muestreo	Suelo	32	50	0.64	67.84	13.85	107.68	0.50	0.76	
	Hojarasca**	12	46	0.26	27.84	12.29	99.68	0.16	0.40	
	Follaje	29	50	0.58	61.84	14.21	107.68	0.44	0.71	
		Sn	146							

** Significativamente diferente a follaje y suelo con 95% de confianza

El follaje en Antigua tiene más CP que la hojarasca y el suelo. Teniendo éste una mayor proporción de CP que las dos anteriores. La hojarasca en Alta Verapaz tiene menos CP que el suelo y el follaje. Siendo esta proporción de un 26% (IC95%, 16-40%), significativamente diferente en comparación con el 64% (IC95%, 50-76%) y el 58% (IC95%, 44-71%) de las otras dos muestras que no son significativamente diferentes, comparando dentro de la misma finca, esto se observa en que los intervalos de confianza al 95% de suelo y follaje respectivamente, se intercalan.

2. Análisis estadístico de las variantes genéticas encontradas en los dos muestreos realizados. Se realizó el análisis de la diversidad genética de cada uno de los tipos de muestras para cada uno de los muestreos, utilizando el índice de Simpson que es una medida de la probabilidad de que dos individuos al azar seleccionados de una muestra pertenezcan a la misma especie (o alguna otra categoría diferente de especie). Se encontraron 4 diferentes variantes genéticas en la muestra de suelo del primer muestreo (cuadro 22), en una muestra de 19 individuos. Se obtuvo un índice de Simpson de 70% (IC95%, 43-97%) valor que se encuentra más cercano a 100 que a cero. Señalando de esta forma la poca diversidad en la muestra.

Cuadro 22: Muestras suelo primer muestreo

Variantes electroforéticas	Código asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	$p \square 3$	$p \square 2$
EBA	A	16	0.842	15	240	0.597	0.709
ECBA	B	1	0.053	0	0	0.000	0.003
EDCBA	C	1	0.053	0	0	0.000	0.003
EDBA	D	1	0.053	0	0	0.000	0.003
	total	19	1	15	240	0.598	0.717

Índice de Simpson	0.702
Índice de diversidad de Simpson	0.298
$s \square 2$	0.017
Límite de confianza inferior	0.438
Límite confianza superior	0.966

En la muestra de hojarasca del primer muestreo (cuadro 23) se encontraron 6 diferentes variantes genéticas, en una muestra de 30 individuos. Se obtuvo un índice de Simpson de 22.2% (IC95%, 15-29%) valor más cercano a cero que a 100, por lo que se podría decir que la diversidad de esta muestra se acerca a infinito de acuerdo a la definición de este índice.

Cuadro 23: Muestras hojarasca primer muestreo

Variantes electroforéticas	Código asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	$p \square 3$	$p \square 2$
EBA	A	10	0.333	9	90	0.037	0.111
ECBA	B	9	0.300	8	72	0.027	0.090
EDCBA	C	4	0.133	3	12	0.002	0.018
EDCBAA0	E	1	0.033	0	0	0.000	0.001
EBAA0	F	5	0.167	4	20	0.005	0.028
EB	G	1	0.033	0	0	0.000	0.001
	total	30	1	24	194	0.071	0.249

Índice de Simpson	0.223
Índice de diversidad de Simpson	0.777
$s \square 2$	0.001
Límite de confianza inferior	0.153
Límite confianza superior	0.293

La segunda muestra con mayor cantidad de variantes genéticas para el primer muestro fue la de follaje (cuadro 24), en la cual se encontraron 5 diferentes variantes genéticas, en una muestra de 46 individuos. Se obtuvo un índice de Simpson de 39% (IC95%, 28-50%) valor más cercano a cero que a 100, por lo que se podría decir que la diversidad de esta muestra se acerca a infinito de acuerdo a la definición de este índice.

Cuadro 24: Muestras follaje primer muestreo

Variantes electroforéticas	Código asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	$p_{\square 3}$	$p_{\square 2}$
EBA	A	26	0.565	25	650	0.181	0.319
ECBA	B	1	0.022	0	0	0.000	0.000
EBAA0	F	6	0.130	5	30	0.002	0.017
EB	G	1	0.022	0	0	0.000	0.000
BA	H	12	0.261	11	132	0.018	0.068
total		46	1	41	812	0.201	0.405

Índice de Simpson	0.392
Índice de diversidad de Simpson	0.608
$s^{\square 2}$	0.003
Límite de confianza inferior	0.280
Límite confianza superior	0.504

De estos resultados pertenecientes al primer muestreo se puede decir que se encontró una mayor variabilidad genética en las muestras de hojarasca y follaje que en la de suelo. Se encontraron 9 diferentes variantes genéticas en la muestra de suelo del segundo muestreo (cuadro 25), en una muestra de 32 individuos. Se obtuvo un índice de Simpson de 18.5% (IC95%, 9-28%) valor más cercano a cero que a 100, por lo que se podría decir que la diversidad de esta muestra se acerca a infinito de acuerdo a la definición de este índice. Esta muestra a diferencia de las otras encontradas en las tres tablas pasadas es la que presenta una mayor cantidad de variantes genéticas en una muestra con una cantidad media de individuos en relación a las otras.

Cuadro 25: Muestras suelo segundo muestreo

Variantes electroforéticas	Código asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	$p_{\square 3}$	$p_{\square 2}$
EBA	A	5	0.156	4	20	0.004	0.024
ECBA	B	12	0.375	11	132	0.053	0.141
EDCBA	C	1	0.031	0	0	0.000	0.001
EDBA	D	3	0.094	2	6	0.001	0.009
BA	H	5	0.156	4	20	0.004	0.024
EBAA0A1	I	3	0.094	2	6	0.001	0.009
EBAA1A2A4A5	J	1	0.031	0	0	0.000	0.001
EBAA2A4A5	K	1	0.031	0	0	0.000	0.001
EBAA0A1A2A3	L	1	0.031	0	0	0.000	0.001
total		32	1	23	184	0.062	0.211

Índice de Simpson	0.185
Índice de diversidad de Simpson	0.815
$s^{\square 2}$	0.002
Límite de confianza inferior	0.092
Límite confianza superior	0.279

De momento los datos pertenecientes al cuadro 25 han sido los que mayor diversidad han mostrado, a diferencia de los datos de suelo del cuadro 22 pertenecientes al primer muestreo. Esto

se hace visible en que, mientras que en el cuadro 22, 16 individuos tenían el perfil genético perteneciente al de Dipel, en el cuadro 25 sólo 5 presentaron ese perfil. Además sólo se encontraron 4 variantes genéticas en el cuadro 22, mientras que en el 25, se encontraron 9. Estos resultados indican que la mayor cantidad de cepas mutantes se encontró en el suelo de la región de Alta Verapaz, y que dentro de éstas se encuentran las cepas nativas.

Le seguía en diversidad a la muestra del cuadro 25, la muestra de hojarasca del segundo muestreo (cuadro 26) en la cual se encontraron 5 diferentes variantes genéticas, en una muestra de 12 individuos. Se obtuvo un índice de Simpson de 42.4% (IC95%, 11-74%) valor más cercano a cero que a 100, por lo que se podría decir que la diversidad de esta muestra se acerca a infinito de acuerdo a la definición de este índice.

Cuadro 26: Muestras hojarasca segundo muestreo

Variantes electroforéticas	Codigo asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	p_i^3	p_i^2
EBA	A	8	0.667	7	56	0.296	0.444
EDCBA	C	1	0.083	0	0	0.001	0.007
EDBA	D	1	0.083	0	0	0.001	0.007
EBAA0	F	1	0.083	0	0	0.001	0.007
BA	H	1	0.083	0	0	0.001	0.007
	total	12	1	7	56	0.299	0.472

Índice de Simpson	0.424
Índice de diversidad de Simpson	0.576
s^2	0.025
Límite de confianza inferior	0.107
Límite confianza superior	0.742

La muestra de follaje del segundo muestreo (cuadro 27), mostró solamente 3 diferentes variantes genéticas, en una muestra de 26 individuos. Se obtuvo un índice de Simpson de 51% (IC95%, 32-71%) valor más cercano a 100 que a 0, por lo que se podría decir que la diversidad de esta muestra es baja, acuerdo a la definición de este índice.

Cuadro 27: Muestras follaje segundo muestreo

Variantes electroforéticas	Código asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	$p_{\square 3}$	$p_{\square 2}$
EBA	A	18	0.692	17	306	0.332	0.479
EDBA	D	3	0.115	2	6	0.002	0.013
BA	H	5	0.192	4	20	0.007	0.037
	total	26	1	23	332	0.340	0.530

Índice de Simpson	0.511
Índice de diversidad de Simpson	0.489
$s_{\square 2}$	0.009
Límite de confianza inferior	0.319
Límite confianza superior	0.703

En cuanto a las comparaciones entre ambas regiones (cuadro 28), se puede encontrar que el suelo del primer muestreo tiene un índice de Simpson de 70% (IC95%, 44-97%) que difiere significativamente del índice de Simpson del suelo del segundo muestreo 18.5% (IC95%, 9-28%). También se encontró que la muestra de hojarasca del primer muestreo tiene un índice de Simpson 22.2% (IC95%, 15-29%) difiere significativamente de la muestra de follaje del segundo muestreo 51% (IC95%, 32-70%).

Cuadro 28: Índice de Simpson para todas las muestras

Muestreo	Muestra	N	D	1-D	IC(inf)95%	IC(sup)95%
Antigua Guatemala	Suelo**	19	0.702	0.298	0.438	0.966
	Follaje	46	0.392	0.608	0.280	0.504
	Hojarasca ^o	30	0.223	0.777	0.153	0.293
Alta Verapaz	Suelo**	32	0.185	0.815	0.092	0.279
	Follaje	26	0.511	0.489	0.319	0.703
	Hojarasca	12	0.424	0.576	0.107	0.742

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

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

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

^oSignificativamente diferente a follaje del segundo muestreo con un 95% de confianza

Comparando entonces ambas regiones, se obtuvo significativamente una mayor diversidad de variantes genéticas en la muestra de suelo de Alta Verapaz comparado con todas las muestras de ambas regiones, cuadro 28. Teniendo ésta un índice de Simpson de 18.5% (IC95%, 9-28%) el más bajo en comparación con todas las demás muestras, con una diversidad cercana a infinito, denotando con esto una mayor riqueza en variantes genéticas y una mayor abundancia en la distribución de las especies. Analizándose 32 individuos para esa muestra los cuales presentaron 9 variantes genéticas.

Siguiendo esta misma línea de comparación entre regiones se resalta la muestra de hojarasca de Antigua Guatemala con un índice de Simpson de 22% (IC95%, 15-29%) con la

muestra de follaje de Alta Verapaz con un índice de Simpson de 51% (32-70%) siendo ambas significativamente diferentes con un 95% de confianza con esto se confirma lo anteriormente dicho con el análisis estadístico de la proporción binomial en donde se asocia una mayor cantidad de variantes genéticas asociadas a la hojarasca en Antigua Guatemala comparado con Alta Verapaz puede ser debido a una mayor densidad de insectos hospederos de *B. thuringiensis* en las hojas del Aguacate en Antigua. La mayoría de las variantes genéticas encontradas en Antigua coincidieron con el perfil presentado por el control positivo Dipel® que se usa en esta región como bioinsecticida. Aunque esto como ya se discutió anteriormente no quiere decir que sea Dipel® necesariamente.

IX. DISCUSIÓN

Se escogieron los lugares de muestreo en el Departamento de Sacatepéquez en donde se utilizan bioinsecticidas derivados de *B. thuringiensis* Berliner var *kurstaki*, conocido comercialmente como BST-88 o Dipel®. Por el contrario en el departamento de Alta Verapaz, que constituye una zona en donde la actividad agrícola no tiene un gran impacto a nivel de la economía nacional, se asumió, que el uso de bioinsecticidas no es una práctica común como alternativa al uso de insecticidas químicos. Debido a estos dos hechos, se dedujo que esta región puede tener una mayor variedad de cepas nativas de *B. thuringiensis* por el menor uso de bioinsecticidas.

De dos fincas, una de cada uno de los dos departamentos mencionados se procesaron 59 muestras, correspondientes a los tres diferentes tipos: suelo, hojarasca y follaje, es decir los elementos correspondientes a la filoesfera del árbol de aguacate. De acuerdo al tipo de muestra que se tenía se realizó un protocolo para el aislamiento de estas bacterias. Los tres protocolos tenían ciertos pasos comunes tales como el calentamiento de las suspensiones en baño maría a 80°C por 15 min para eliminar a las células vegetativas y su enfriamiento, dejando solamente esporas en la suspensión, además se sembraron en agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID, el cual es un medio selectivo (debido a la utilización de antibióticos) para las bacterias relacionadas con *B. thuringiensis*.

En el caso del protocolo de aislamiento a partir de muestras de follaje, éste fue el único protocolo en el que se utilizó agitación debido a que el follaje expuesto a luz UV no proveía de las condiciones adecuadas para la existencia de esporas, sino mas bien de bacterias por lo tanto se debía tratar de recuperar a la población bacteriana existente sobre la superficie de las hojas. En cuanto al protocolo de aislamiento a partir de muestras de hojarasca, debido a que estas se encontraban bajo condiciones favorables de sombra y humedad no fue necesario agitarlas, sino que se dejaron toda la noche en caldo nutritivo con agitación manual esporádica. Estos pasos aunados al uso del agar específico ayudaron a aumentar las posibilidades de que los aislados correspondieran a *B. thuringiensis*, aunque era posible que algunos de ellos pertenecieran a *B. cereus* o a otros. Como en el caso de algunas colonias que presentaron características rizoides que no concordaban con las que presentarían usualmente las colonias de *B. cereus* o *B. thuringiensis* y que solamente difieren en la presencia de inclusiones cristalinas.

Para el segundo muestreo se realizó el mismo procedimiento que para el primer muestreo, solo que en el caso del aislamiento en agar cromogénico para *B. cereus* de OXOID, a éste se le agregó emulsión de yema de huevo. La emulsión de yema de huevo ayudó al crecimiento de los aislados debido a que aportó una mayor cantidad de nutrientes. Se tenía la hipótesis en un inicio, de que al posiblemente encontrar una menor cantidad de aislados que no correspondieran al tipo presentado por Dipel[®], i.e., nativos, las posibilidades de crecimiento y adaptación de los mismos serían menores que el de la cepa comercializada con el bioinsecticida. Por lo que se debía agregar una ayuda a su crecimiento al agregar la emulsión de yema de huevo.

Para la identificación de los aislados se realizaron dos frotos de cada aislado, uno se tiñó para Gram y el otro con azul de Coomassie para la identificación de cristales. La única prueba para la confirmación de *B. thuringiensis* utilizada, fue la realizada con la tinción de cristales con azul de Coomassie, ver resultados cuadros 9 y 11. La observación de los frotos se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico parascopal. Los cristales fueron observados luego de 48 horas de cultivo de los aislados, porque esto le daba tiempo a las bacterias a esporular y producir subsecuentemente las inclusiones cristalinas. Estas inclusiones cristalinas se observaron al microscopio como pequeños puntos, algunos de ellos con picos, de un color azul más intenso, que el presentado por las bacterias o las esporas. Los cristales se encontraron coronando en algunos casos a las esporas y en otros estaban dispersos en el frote. Por tal razón fue posible identificar el aislado como cristal positivo. La presencia de cristales y la morfología de la colonia a las 24 horas sirvió como medio de discriminación debido a que al encontrarse colonias que no cumplieran con las características morfológicas descritas en la literatura era posible identificar cual aislado no iba a presentar un frote positivo. De acuerdo a la definición dada en este estudio, se estableció que para la clasificación como *B. thuringiensis* la colonia debía cumplir con la morfología específica y la presencia de cristal en el frote.

Se observó además que durante el aislamiento de las cepas principalmente durante el procesamiento de las pertenecientes al primer muestreo, que el crecimiento de algunas era rápido y agresivo, encontrándose a las 24 horas colonias de tamaños considerables. Con una gran movilidad dentro del agar del cultivo. Luego de la visualización de 296 frotos se encontraron, 98 colonias cristal positivo para el primer muestreo y 73 colonias cristal positivo para el segundo muestreo. Las colonias cristal positivo observadas cumplieron con las características de *B.*

thuringiensis, ya que todas fueron Gram positivo y cristal positivo, definidas en el estudio, cuadros 8 y 10.

Se obtuvo significativamente un mayor aislamiento de cepas cristal positivo (CP) en hojarasca y follaje en Antigua, comparado a los mismos nichos en Alta Verapaz, cuadros 20-21. El 60% (IC95%, 46-72%) de los aislados de la hojarasca de Antigua eran CP mientras que sólo el 26% (IC95%, 16-40%) de los aislados de la hojarasca en Alta Verapaz eran CP. El suelo no difiere en la proporción de CP en las dos regiones, esto debido a que ambos intervalos de confianza se intercalan. La presencia de más cepas CP asociadas a las hojas (follaje y hojarasca) en Antigua Guatemala, comparado con Alta Verapaz puede ser debido a una mayor densidad de insectos hospederos de *B. thuringiensis* en las hojas del aguacate en Antigua.

Con base a los análisis de los variantes de cepas CP con 16S del ADN ribosomal, se sugiere que las cepas en Antigua Guatemala son parecidas a la cepa de Dipel® que se usa en esta región de del país como bioinsecticida. Es posible que la alta prevalencia de cepas CP en Antigua esté asociada a la dispersión por medio de aerosoles de Dipel® de fincas adyacentes y la presencia de insectos hospederos para esta cepa. El follaje en Antigua tiene más CP que la hojarasca y el suelo. Esto sugiere que las presuntas cepas de *B. thuringiensis* sobreviven mejor en el follaje, por lo que su aplicación en el árbol del aguacate podría ser más eficiente en el follaje. Esta mayor tasa de sobrevivencia en el follaje podría deberse a una ausencia de competencia con otra microbiota o también podría deberse a que estando en el follaje sobreviven de mejor manera a la radiación UV proveniente el sol. Por otro lado, se podrían desarrollar métodos de encapsulación que le den mayor viabilidad en el suelo, donde se encuentran las larvas de las principales plagas del aguacate.

La hojarasca en Alta Verapaz tiene menos CP que el follaje y el suelo, pudiendo esto deberse a que la microbiota al pie del árbol represente una fuerte competencia para *B. thuringiensis* o bien que simplemente las condiciones climáticas de esta región no favorezcan al crecimiento positivo de esta bacteria. Se obtuvieron 171 aislados positivos, los cuales fueron sometidos a la segunda fase del estudio que consistía en el análisis de su perfil genético de mutaciones para la región 16S del ADN ribosomal por medio de la técnica de SSCP. Se escogió la región del ADN ribosomal que contiene el gen 16S para poder determinar las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados encontrados debido a que corresponde a una región fácilmente aislable y a una secuencia que cambia lentamente en el tiempo. Con el análisis de esta

región se pueden obtener perfiles electroforéticos de las variantes genéticas en esta región presentados por los aislados obtenidos a partir de las muestras de aguacate, esperando encontrar perfiles que sean diferentes a los controles que puedan denotar un serovar posiblemente diferente de éstos.

La característica principal por la que se eligió la técnica de SSCP es debido a que permite encontrar cambios tan pequeños como el cambio en una base nitrogenada en la secuencia del gen, lo cual se observa en cada perfil de bandas producidas por las muestras, debido a que cada banda producida es una mutación puntual ocurrida. La optimización de la técnica incluyó un cambio en la concentración propuesta para los geles en el protocolo original utilizado en el laboratorio, cambiando los geles de poliacrilamida al ocho por ciento por geles con una concentración al doce por ciento. Esto permitió una mejor resolución de las bandas que se deseaban observar.

Estas relaciones filogenéticas no implican que las bacterias que muestren el mismo perfil de mutaciones en la región 16S del ADN ribosomal sean exactamente el mismo tipo de bacterias, sino que solamente son iguales en este gen. Esta aclaración surge debido a que (ver figura 16), si se observa, se trabajaron inicialmente tres controles positivos: 6106 *Bacillus thuringiensis* serovar sotto, serovar (4a4b) (DSMZ); 6112 *B. thuringiensis* serovar morrisoni serovar (8a8b) (DSMZ) y Dipel®: *B. thuringiensis* Berliner var *kurstaki* (BST-88, Agrícola El Sol). De estos tres controles, el segundo y el tercero presentaban el mismo perfil de mutaciones por lo que se decidió seguir utilizando solamente el de Dipel®. Esto sin embargo, no implicaba que ambas cepas correspondieran al mismo tipo de bacteria ya que una era serovar morrisoni mientras que la otra era variedad *kurstaki*.

Estos controles tienen el siguiente perfil genético: EDCBA y EBA respectivamente. Por lo tanto los aislados que tuvieran ese perfil genético no podían considerarse como nativos de la región. Aunque en este punto surge la duda, para afirmarlo, debido a que como se dijo anteriormente cuando se comparaban los controles positivos, con el mismo perfil genético para las mutaciones no indica necesariamente decir que sean la misma bacteria. Por lo tanto es posible recomendar llevar a cabo una prueba más. Y para comprobar si ambas bacterias pertenecen al mismo tipo se puede hacer un PCR en donde se compararían los genes de las proteínas *cry* que presente cada aislado o bien mandar a secuenciar a representantes de grupos de aislados con el mismo perfil de mutaciones puntuales en la región 16S del ADN ribosomal. Se corre el riesgo igualmente de que no se examinen todos los aislados que mostraran tal perfil y fueran estas

diferentes cepas de bacterias que estuvieran siendo arbitrariamente colocadas juntas en un grupo por presentar un mismo perfil genético de mutaciones en esta región.

Los perfiles genéticos fueron asignados en relación al perfil de los controles, estos a su vez fueron asignados conforme su migración en el gel y usando la escalera o “ladder” de ADN lineal de doble hebra de 1Kb (kilobase, es decir 1000 pares de bases). Este ladder contiene fragmentos que van desde 500 pb hasta 12 kb. Las bandas del ladder contienen de una a doce repeticiones de un fragmento de ADN de 1018 pb. En adición a estas doce bandas también contiene fragmentos de un vector de ADN que van desde 75-1636 pb. Este ladder fue utilizado como referente tal como se explica en los resultados. Siempre debe aclararse que se agruparon de esta manera por la similitud de las bandas en esta región no porque necesariamente se supiera que fueran el mismo tipo de bacteria.

Al evaluar todos los aislados surgieron nuevas bandas presentando migraciones diferentes a las presentadas por los controles, dentro de estas se encontraron las bandas A0-A6. Estas bandas migraban con relación al ladder en un rango desde 4072 pb hasta 8144 pb y representaban a las conformaciones de hebra única con las migraciones más lentas, con respecto a las demás bandas. Por tal razón utilizando solamente esta técnica no es posible determinar si se encontraron de manera definitiva más aislados que fueran Dipel[®] en una región que en otra, y solo se podría decir que se encontraron aislados con el mismo perfil genético de mutaciones en la región 16S del ADN ribosomal que Dipel[®].

En el primer muestreo se trabajó con 38 aislados con perfiles genéticos diferentes a los presentados por los controles positivos de 98 aislados cristal positivo analizados. Mientras que para el segundo muestreo se encontraron 40 aislados con perfiles diferentes de los controles positivos de 73 aislados cristal positivo analizados, resultados cuadros 12-19 y se llevó a cabo el análisis estadístico de la diversidad genética de los aislados encontrados en ambas regiones. Para esto se utilizó el índice de Simpson, el cual es una medida de la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar de una muestra pertenezcan a la misma especie o alguna otra categoría diferente a especie y da una idea de la riqueza, uniformidad y diversidad de la muestra. Tal como en este caso se está utilizando el término variantes genéticas debido a que todos los aislados analizados por ser cristal positivo pertenecían a la misma especie, *B. thuringiensis*, con la diferencia de que presentaban distintos perfiles genéticos o variantes electroforéticas en la región 16S del ADN ribosomal.

Al analizar las muestras pertenecientes a la finca de Sacatepéquez, se las puede dividir en cada uno de los tres tipos. Se encontró que las muestras de suelo presentaban muy poca diversidad en comparación con las de hojarasca y follaje de esta misma región (ver resultados cuadros 22-24). Siendo la de hojarasca seguida de la de follaje las más diversas con valores que superaban al 50% de diversidad. Esto confirma las teorías iniciales acerca del uso de Dipel® como bioinsecticida en la región. Aunado al éxito de adaptación y reproducción de esta variante sobre las posibles nativas de la región. Confirmándose en que de 19 aislados positivos 16 coincidían con el mismo perfil de Dipel®. Analizando como un todo a los resultados totales de esta finca, se encontró que 52 de 95 aislados tenían el perfil de Dipel®, y un total de 8 variantes genéticas totales. Por lo que se puede decir que se encontró que más de la mitad de los aislados de Sacatepéquez tenían un perfil de mutaciones en la región 16S del ADN ribosomal igual al de Dipel®, aunque no necesariamente fueran ese mismo tipo de bacteria como ya se había explicado.

Igualmente al analizar los resultados obtenidos luego del análisis molecular de los aislados de Alta Verapaz y a diferencia que los aislados de la finca de Sacatepéquez, se encontró que la muestra que mayor diversidad mostró fue la de suelo, con un total de 9 variantes genéticas y un índice de diversidad mayor al 80%. En este segundo muestro las muestras menos diversas fueron las de hojarasca y follaje (ver resultados cuadros 25-28). Estos resultados apoyan la deducción inicial, de que en el territorio de Alta Verapaz se encontraría una mayor cantidad de aislados con perfiles genéticos diferentes a los de los controles utilizados, esto se evidencia en que se encontraron 31 de 70 aislados tenían el perfil de Dipel®, y un total de 10 variantes genéticas.

Dentro de estos aislados se encontraron los más variados perfiles genéticos algunos de los cuales poseían las mayores bandas vistas. Por tal razón es posible asegurar que la mayor cantidad de cepas mutantes se encontró en el suelo de la región de Alta Verapaz, y se puede inferir que dentro de éstas se podrían encontrar las cepas nativas debido a la mayor biodiversidad encontrada en este tipo de muestra. Se confirman entonces ambas hipótesis propuestas al inicio del estudio, en las cuales se proponía que las presuntas cepas de *B. thuringiensis* diferían microscópicamente y genéticamente en la región 16S del ADN ribosomal y además que la biodiversidad de las mismas variaba de acuerdo a la región ecogeográfica de donde provenían. Todo esto confirmándose en los resultados obtenidos a partir de este estudio.

X. CONCLUSIONES

1. La única prueba para la confirmación microbiológica de *B. thuringiensis* utilizada, fue la realizada con la tinción de cristales con azul de Coomassie, de acuerdo a la definición dada en el estudio para la clasificación positiva como este tipo de bacilo.

2. Las colonias cristal positivo cumplieron con las características morfológicas que presenta la literatura de las colonias de *B. thuringiensis*, las cuales son: circular, blancas, planas, onduladas o enteras.

3. El 60% (IC95%, 46-72%) de los aislados de la hojarasca de Antigua eran CP mientras que sólo el 26% (IC95%, 16-40%) de los aislados de la hojarasca en Alta Verapaz eran CP.

4. Más del 50% de los aislados totales de la finca de Sacatepéquez se encontró, poseían el mismo perfil genético de Dipel[®], esto no necesariamente indica que sean el mismo tipo de bacteria.

5. Con base a los análisis de los variantes de cepas CP con 16S del ADN ribosomal, se sugiere que las cepas en Antigua Guatemala son parecidas a la cepa de Dipel[®] que se usa en esta región de del país como bioinsecticida.

6. El follaje en Antigua tiene más CP que la hojarasca y el suelo. Esto sugiere que las presuntas cepas de *B. thuringiensis* sobreviven mejor en el follaje, por lo que su aplicación en el árbol del aguacate podría ser más eficiente en el follaje.

7. Se obtuvo significativamente una mayor diversidad de variantes genéticas en la muestra de suelo de Alta Verapaz comparado con todas las muestras de ambas regiones, con un índice de Simpson de 18.5% (IC95%, 9-28%) el más bajo en comparación con todas las demás muestras, con una diversidad cercana a infinito.

8. La mayor cantidad de cepas mutantes se encontró en el suelo de la región de Alta Verapaz, y se puede inferir que dentro de éstas se podrían encontrar las cepas nativas. Analizándose 32 individuos para esa muestra los cuales presentaron 9 variantes genéticas.

XI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar muestreos en otras áreas del país para identificar los perfiles de mutaciones puntuales en la región 16S del ADN ribosomal de *B. thuringiensis* de las cepas encontradas en la filoesfera del aguacate Hass.
2. Es importante establecer otra prueba, de preferentemente molecular, además de la microscopía para cristal, como prueba positiva para el aislamiento de *B. thuringiensis*.
3. Una posible prueba confirmativa, puede ser una prueba específica para la detección de los genes *cry* en las bacterias.
4. Se recomienda secuenciar la región del 16S de las cepas que presentaron una mayor variabilidad en la misma con respecto a los controles positivos utilizados para el estudio, para determinar si los aislados que tienen perfiles genéticos iguales para la región del 16S del ADN ribosomal son necesariamente las mismas bacterias o no.
5. Se recomienda también, correr en geles de agarosa los productos de PCR obtenidos a partir de la técnica de SSCP para poder comprobar si entre ambas secuencias del gen de la región 16S del ADN ribosomal varía en 50 pb. Si se presenta esta variación se puede decir que este producto de PCR pertenece a una cepa de *B. cereus* y no a una de *B. thuringiensis*.

XI. BIBLIOGRAFÍA

ARTÍCULOS CONSULTADOS

- Agaisse, H. y D. Lereclus. 1995. How Does *Bacillus thuringiensis* Produce so Much Insecticidal Crystal Protein?. *J Bacteriol.* 177(21): 6027–6032.
- Apaydin, O; A. Fazil; S. Harsa y H. Güneş. 2005. Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World Journal of Microbiology y Biotechnology.* 21: 285-292.
- Black, B. SSCP en Minigeles (BIORAD). Colorado State University, Estados Unidos. 6 de Julio 1998. Protocolo aplicado en el laboratorio de Chagas, Universidad del Valle de Guatemala.
- Broderick, N.A.; K. F. Raffa y J. Handelsman. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS.* 103(41): 15196-15199.
- Bulla, L.A; K. J. Kramer y L. I. Davidson. 1977. Characterization of the Entomocidal Parasporal Crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol.* 130(1): 375-383.
- Carlson, C. R. y A. B. Kolstø. 1993. A Complete Physical Map of a *Bacillus thuringiensis* Chromosome. *J Bacteriol.* 175(4): 1053-1060.
- Cavados, C.F.G.; S. Majerowicz; J.Q. Chaves; C.J.P.C. Araújo-Coutinho y L. Rabinvitch. 2004. Histopathological and Ultrastructural Effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* in the Midgut of *Simulium pertinax* Larvae (Diptera, Simuliidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 99(5): 493-498.
- Chatterjee, S.N.; T. Bhattacharya; T.K. Danzar y G. Chandra. 2007. Ecology and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in Soil Environment. *African Journal of Biotechnology.* 6(13): 1587-1591.
- Chattopadhyay, A.; N.B. Bhatnagar y R. Bhatnagar. 2004. Bacterial Insecticidal Toxins. *Critical Reviews in Microbiology.* 30(1): 33–54 pp.

- Couche, G.A.; M.A. Pfannenstiel y K. W. Nickerson. 1987. Structural Disulfide Bonds in the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Protein Crystal. *Journal Bacteriology*. 169(7): 3281-3288.
- Fujita, K. y J. Silver. 1994. Single-Strand Conformational Polymorphism. *Genome Research, PCR Methods*. 4: 137-140.
- Ghelardi, E.; F. Celandroni; S. Salvetti; D.J. Beecher; M. Gominet; D. Lereclus; A.C.L. Wong y S. Senesi. 2002. Requirement of flhA for Swarming Differentiation, Flagellin Export, and Secretion of Virulence-Associated Proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol*. 184(23): 6424-6433.
- Griego, V.M. y K.D. Spence. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* Spores by Ultraviolet and Visible Light. *Appl. Environ Microbiol*. 35(5): 906-910.
- Grundmann, H.; S. Hori y G. Tanner. 2001. Determining Confidence Intervals when Measuring Genetic Diversity and the Discriminatory Abilities of Typing Methods for Microorganisms. *J. Clinical Microbiology*. 39(11): 4190-4192.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. *Genome Research, PCR Methods Appl*. 1: 34-38.
- Itoua-Apoyolo, C.; L. Drif; J.M. Vassal; H. DeBarjac; J.P. Bossy; F. Leclant y R. Frutos. 1995. Isolation of Multiple Subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a Population of the European Sunflower Moth, *Homoeosoma nebulella*. *Appl. Environ. Microbiol*. 61(12): 4343-4347.
- Kasuga, T.; J. Cheng y K. Mitchelson. 1995. Metastable Single-strand DNA Conformational Polymorphism Analysis Results in Enhanced Polymorphism Detection. *Genome Research, PCR Methods Appl*. 4: 227-233.
- Kirk, J.L.; L.A. Beaudette; M. Hart; P. Moutoglis; J.N. Klironomos; H. Lee y J.T. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbial Methods*. 58: 169-188.
- Leren, T.P.; K. Solberg; O.K. Rødningen; L. Ose; S. Tonstad y K. Berg. 1993. Evaluation of Running Conditions for SSCP Analysis: Application of SSCP for Detection of Point Mutations in the LDL Receptor Gene. *Genome Research, PCR Methods Appl*. 3: 159- 162.
- Maagd, R.A.; A. Bravo y N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to

- colonize the insect World, (Review). *TRENDS in Genetics*. 17(4): 193- 199.
- Newcombe, R.G. 2000. Statistical applications in orthodontics, Part II. Confidence intervals for proportions and their differences. *Journal of Orthodontics*. 27(4): 339- 340.
- Nicholls, C.N.; W. Ahmad y D.J. Ellar. 1989. Evidence for two Different types of Insecticidal P2 Toxins with dual Specificity in *Bacillus thuringiensis* Subspecies. *J Bacteriol*. 171(9): 5141-5147.
- Niedmann, L. y L. Meza-Basso. 2006. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (*Tuta Absoluta* Meyrick; *Lepidoptera: Gelechiidae*) en Chile. *AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE)*. 66(3): 235-246.
- Peyronnet, O.; V. Vachon; R. Brousseau; D. Baines; J.L. Schwartz y R. Lapradel. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* Toxins on the Membrane Potential of Lepidopteran Insect Midgut Cells. *Appl And Environ Microbiol*. 63(5): 1679–1684.
- Rampersad, J. y D. Ammons. 2005. A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiology*. 5:52.
- Ross, F.C. 1993. *Introductory Microbiology*. Charles E. Merrill Publishing Co., United States of America. 128-134.
- Satz, L.M. y A.R. Kornbliht. 1993. La Reacción en Cadena de la Polimerasa, El método y sus aplicaciones. *Ciencia Hoy*. 4(23). [sin número de páginas].
- Schnepf, E.; N. Crickmore; J. Van Rie; D. Lereclus; J. Baum; J. Feitelson; R. Zeigler y D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): 775–806.
- Smith, R. A. y G.A. Couche. 1991. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. *Appl And Environ Microbiol*. 57(1): 311-315.
- Soto, D. y S. Sukumar. 1992. Improved Detection of Mutations in the p53 Gene in Human Tumors as Single-stranded Conformation Polymorphs and Double-stranded Heteroduplex DNA. *PCR Methods Appl*. 2: 96-98.
- Tal, M.; A. Silberstein y E. Nusser. 1980. Why does Coomassie Brilliant Blue R Interact Differently with

Different Proteins?. The Journal of BIOLOGICAL CHEMISTRY. Aug 1980. 260(18): 9976-9980.

Taylor, S.H. y J.M. Thorp. 1959. Properties and Biological Behaviour of Coomasie Blue. Br Heart J. 21(4): 492-496.

Tucker, E.; A. Buda; N. Janghra; J. Baker; J. Coad; M. Moorghan; M. Halver; P. Dettmar y M. Pignatelli. 2003. Abnormalities of the Cadherin-Catenin Complex in Chemically-Induced Colo-Rectal Carcinogenesis. Proceedings of the Nutrition Society. 62(1): 230-231.

Woese, C.R. y G. E. Fox. 1977. Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The primary Kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. 74(11): 5088-5090.

COMUNICACIONES ORALES

Arévalo, L.A. 04/04/2008. Laboratorio de Entomología Aplicada del Centro de Estudios Agrícolas y Forestales, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala (UVG). Guatemala, C.A. e-mail: laarevalo@uvg.edu.gt. Teléfono: 2364-0336/ 5200-7524 ext. 479.

Mendizábal, R. 10/02/2008. Laboratorio de Malaria, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala (UVG). Guatemala, C.A. e-mail: rmendizabal@GT.CDC.GOV. Teléfono: 2364-0336 al 40 ext. 426. Fax: 2369-7539.

LIBROS

Alberts, B; A. Jonson; J. Lewis; M. Raff; K. Roberts y P. Walter. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4ta ed. Garland Science, Estados Unidos. 850 pp.

Álvarez, M. 1998. Laboratorio de Análisis Bacteriológico de Agua, UVG, Protocolos. Universidad del Valle de Guatemala, Instituto de Investigaciones, Guatemala. 40 pp.

Berg, J.M.; J.L. Tymoczko y L. Stryer. Biochemistry. 5th ed, W. H. Freeman and Company, The United States of America. pp 450-9.

Brown, T.A. 2006. Genomes. 3rd ed. Garland Science, United Kingdom. 750 pp.

Butler, J.M. 2005. Forensic DNA typing: biology, technology and genetics of STR markers. Academic

Press. The United States of America. 660 pp.

Echan, L. A. y D. W., Speicher. 2004. Electrophoresis, Protein Detection in Gels Using Fixation. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos. pp 1495-1512.

Erlich, H. A. 1989. PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification. MacMillan Publishers LTD. Estados Unidos. pp 7-14 y 15.

Gallagher, S.R. 1995. One-Dimensional Electrophoresis Using Nondenaturing Conditions. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos. pp 1448-1458.

Hernández, R.S.; C. Fernández-Collado y P. Baptista. 2006. Metodología de la Investigación. 4ta ed, McGraw-Hill, Interamericana editores, S.A., de C.V. México. pp 204-214.

Innis, M. A.; D. H. Gelfand; J. J. Sninsky; T. J. White. 1990. PCR Protocols, A guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., Estados Unidos. pp 40- 43.

Karp, G. 1998. Biología Celular y Molecular. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., México. pp 408-450.

Lovrien, R y Matulis. 1995. Assays for Total Protein, Detection and Assay Methods. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos. pp 1-24.

Lynch, M. J.; S. S. Rápale; L. D. Mellor; P. D. Spare y M. J. D. Inwood. 1977. Métodos de Laboratorio. 2da ed, Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México. pp 924-925.

Mullis, K. B.; F. Ferré y R. A. Gibbs. 1994. PCR, The Polymerase Chain Reaction. Birkhäuser, Estados Unidos. pp 129-133.

Skoog, D. A.; F. J. Holler y T. A. Nieman. 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5ta ed, Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U. España. pp 125-150.

PÁGINAS DE INTERNET

Oldroyd, B.; S. Lapidge y R. Mackay-Wood. Pedigree Analysis. Fecha desconocida. School of Biological Sciences, University of Sydney. Australia. [con acceso el 26 de febrero 2008]. [web en línea: <http://bugs.usyd.edu.au/DNA/DNAextrn.html>]

OXOID. Culture Media Supplements, EGG YOLK EMULSION. 2001-2007. [con acceso el 7 de septiembre 2007]. [web en línea: http://www.oxid.com/UK/BLUE/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0047&sec=&org=&c=UK&lang=EN] y CHROMOGENIC BACILLUS CEREUS AGAR. [con acceso el 7 de septiembre 2007]. [web en línea: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1036&org=9&c=UK&lang=EN].

PROGRAMAS DE BIOINFORMÁTICA DISPONIBLES EN LÍNEA UTILIZADOS PARA LA ALINEACIÓN DE SECUENCIAS Y BUSQUEDA DE GENES:

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Blast Genome. [con acceso el 3 de septiembre de 2007]. [base de datos en línea: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tree.cgi]

Entrez Nucleotide Database. National Center for Biotechnology Information (NCBI). [con acceso el 3 de septiembre de 2007]. [base de datos en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>].

European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI). ClustalW2. [con acceso el 3 de septiembre de 2007]. [base de datos en línea: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>].

PROGRAMA DISPONIBLE EN LÍNEA UTILIZADO PARA EL ANÁLISIS DE INICIADORES O PRIMERS

Integrated DNA Technologies (IDT). SciTools. OligoAnalyzer versión 3.1. [con acceso el 3 de septiembre de 2007]. [base de datos en línea: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>].

REVISTAS

REVISTAS DE PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA

Aguacate. 2005. MAGActual. La Revista del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Año 02. No. 13. 17 pp. [con acceso el 3 de septiembre de 2007]. [web en línea: http://www.maga.gob.gt/maga_content/magactual/2005novdic/index.htm]. [web en línea y link específico: http://www.maga.gob.gt/maga_content/magactual/2005novdic/el_aguacate.htm]

BIOLOG. 2003. Differentiating Gram-negative and Gram-positive Bacteria. MicrologTM Minutes. 1(1): 1-5 pp.

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. [con acceso el 3 de septiembre de 2007]. [web en línea: http://www.icta.gob.gt/reco_frutales.htm]. [web en línea y link específico: http://www.icta.gob.gt/fpdf/recom_frut_ls/cultivoaguacate.PDF].

XII. ANEXOS

Reactivos a utilizar con el UltraClean™, Soil DNA Isolation Kit (catalog # 12800-100, 100 preps) (Mo Bio Laboratories, Inc.)

Solución de cuentas (Bead Solution): contiene Isotiocianato de Guanidina y partículas inertes. La cual es una solución buffer que dispersará las partículas de suelo (con ayuda de las cuentas) e iniciará a disolver los ácidos húmicos.

Solución S1: contiene una solución acuosa de Tris(hidroximetil) aminometano/ ácido hidroclorehídrico y dodecil sulfato de sodio (SDS). Esta solución contiene SDS el cual es un detergente que ayuda en la lisis de las células. El detergente rápidamente rompe los ácidos grasos asociados con la membrana celular de varios organismos.

Solución Removedora de Inhibidores (IRS, por sus siglas en inglés): Este paso de precipitación es requerido solo si el ADN va a ser utilizado para PCR. Es un reactivo diseñado para precipitar ácidos húmicos y otros inhibidores del PCR. Los ácidos húmicos son generalmente de color café. Pertenecen a un gran grupo de compuestos orgánicos asociados con muchos suelos que tienen altos contenidos de material orgánico.

Solución S2: Solución acuosa de acetato. Contiene un reactivo que ayuda en la precipitación de proteínas. Es importante remover las proteínas contaminantes que pueden reducir la pureza del ADN e inhibir las posteriores aplicaciones de ese ADN.

Solución S3: Solución acuosa de Guanidina HCl. La solución S3 es una solución salina ligadora del ADN. El ADN se une a la sílica en presencia de altas concentraciones de sal.

Solución S4: Solución de etanol al 70% (preparada en el laboratorio) o bien solución acuosa de Tris (hidroximetil) aminometano/ ácido hidroclorehídrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cloruro de sodio, alcohol etílico al 50%. La solución S4 es un lavado con base de etanol utilizada para remover residuos de sal, ácidos húmicos y otros contaminantes mientras que permite que el ADN permanezca unido a la membrana de sílica. Se puede lavar más de una vez el ADN para limpiarlo mejor. Su completa remoción es crítica para las posteriores aplicaciones del ADN.

Solución S5: Buffer de elución, solución acuosa de Tris(hidroximetil) aminometano/ ácido hidroclorehídrico. La solución S5 pasa a través de la membrana de sílica, liberando al ADN unido a la misma, haciéndolo fluir a través de ella y llevándolo al siguiente tubo. La solución S5 es una solución de Tris 10 mM con un pH 8.0 y no contiene sal.

Explicación de los pasos del protocolo para la extracción de ADN

1. *Esta es la primera parte del procedimiento de lisis por medios mecánicos.*
2. *Se utilizará para mezclar correctamente la muestra de la colonia bacteriana y la solución buffer.*
3. *La solución S1 contiene SDS. Si este se enfría, se precipitará. Calentar a 60°C y disolverla nuevamente el SDS. La solución S1 puede utilizarse mientras está caliente.*
4. *SDS (dodecil sulfato de sodio) es un detergente que ayuda en la lisis de las células. El detergente rompe los ácidos grasos y lípidos asociados con la membrana celular de varios organismos.*
5. *La solución IRS es un reactivo diseñado para precipitar inhibidores de PCR. Esta precipitación es necesaria si se pretende utilizar el ADN para PCR.*
6. *Lisis mecánica y química es inducida en este paso. El protocolo utilizará una combinación de ambas. Al agitar al azar las cuentas, estas chocan unas con otras y con las células microbianas causando su rompimiento.*
7. *Particulados incluyendo debris celular o cuentas, formarán un pellet o precipitado en este punto. El ADN será el líquido sobrenadante.*
8. *La solución S2 contiene un reactivo precipitador de proteínas. Es importante remover las proteínas contaminadoras que podrían reducir la pureza del ADN e inhibir más adelante las aplicaciones para el ADN.*
9. *El sedimento en este punto contiene residuos de debris celular y proteínas. Para mejor rendimiento del ADN evite transferir parte del pellet.*
10. *La solución S3 es una solución salina que se une al ADN. El ADN se une a la sílica en presencia de altas concentraciones de sal.*
11. *El ADN es selectivamente unido a la membrana de sílica que se encuentra en el tubo de filtro spin. Casi todos los contaminantes pasaran a través de la membrana, dejando solamente al ADN deseado atrás.*
12. *La solución S4 es una solución de lavado de base de etanol usada para limpiar el ADN que se encuentra unido a la membrana. Esta solución de lavado remueve residuos de sales, ácido húmico (en caso la muestra hubiera sido de suelo) y otros contaminantes mientras que permite al ADN permanecer unido a la membrana. Se puede lavar más de una vez el ADN si se desea. Esta solución se compra por aparte o bien se puede hacer en el laboratorio (solución de etanol al 70%).*
13. *Es necesario evitar salpicaduras de la solución S4 en el filtro de membrana.*
14. *La solución S5 debe de mojar todo el filtro. Lo que dará como resultado una liberación más eficiente del ADN deseado.*
15. *A medida que la solución S5 pase por el filtro de membrana de sílica, el ADN es liberado y fluye a través de la misma al tubo de recolección. El ADN es liberado debido a que solo se puede unir al*

filtro de membrana de sílica en presencia de sales. La solución S5 es Tris 10 mM (pH 8.0) y no contiene sal.

Selección de Iniciadores o primers. Los iniciadores o primers serán seleccionados para la diferenciación molecular de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de la filoesfera del árbol de aguacate Hass de la siguiente forma:

1. Se buscarán las secuencias para el gen ARN ribosomal 16S de *B. thuringiensis* y *B. cereus* en GenBank²⁰ que es la base de datos de NIH de secuencias genéticas, ahí se puede encontrar una colección de secuencias de ADN disponibles al público.

2. Estas secuencias serán colocadas en formato FASTA antes de ser copiadas para poder ser alineadas correctamente.

3. Se alinearán las secuencias del gen de diferentes serovares de *B. thuringiensis* y de *B. cereus* y se identificarán las áreas que permitan diferenciar los serovares por presencia de diferencias puntuales (resaltado). Para esta alineación se utiliza el programa CLUSTALW²¹.

Cebador hacia adelante o Primer Forward

50 F 5'ACATGCAAGTCGAGCGAAT 3', y

Cebador Reverso o Primer Reverse

222R v2 5'TCCATCCATAAGTGACAG 3'

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

gi | 145578058 | gb | EF210312.1 | -----T 1
gi | 145578057 | gb | EF210311.1 | -----T 1
gi | 151940245 | gb | AY461762.2 | TTCGCCTTGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCATAAT 50
gi | 151940244 | gb | AY461761.2 | TTCGCCTTGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCATAAT 50
gi | 145578043 | gb | EF210297.1 | -----T 1
gi | 145578045 | gb | EF210299.1 | -----T 1
gi | 145578056 | gb | EF210310.1 | -----T 1
gi | 145578061 | gb | EF210315.1 | -----T 1
*

gi | 145578058 | gb | EF210312.1 | ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCG 51
gi | 145578057 | gb | EF210311.1 | ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCG 51
gi | 151940245 | gb | AY461762.2 | ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCG 100
gi | 151940244 | gb | AY461761.2 | ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCG 100
gi | 145578043 | gb | EF210297.1 | ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGGGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCG 51
gi | 145578045 | gb | EF210299.1 | ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCG 51
gi | 145578056 | gb | EF210310.1 | ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCG 51
gi | 145578061 | gb | EF210315.1 | ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCG 51
*****

gi | 145578058 | gb | EF210312.1 | CCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC 101

```

²⁰ Entrez Nucleotide Database. Visitada: 03/09/2007. Página Web:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>.

²¹ European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI). ClustalW2. Visitada: 03/09/2007. Página web:

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

gi		145578057		gb		EF210311.1		GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC	101
gi		151940245		gb		AY461762.2		GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC	150
gi		151940244		gb		AY461761.2		GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC	150
gi		145578043		gb		EF210297.1		GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC	101
gi		145578045		gb		EF210299.1		GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC	101
gi		145578056		gb		EF210310.1		GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC	101
gi		145578061		gb		EF210315.1		GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC	101

gi		145578058		gb		EF210312.1		TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAACATGCATGGTTCCG	151
gi		145578057		gb		EF210311.1		TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAACATGCATGGTTCCG	151
gi		151940245		gb		AY461762.2		TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAACATGCATGGTTCCG	200
gi		151940244		gb		AY461761.2		TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAACATGCATGGTTCCG	200
gi		145578043		gb		EF210297.1		TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAACATGCATGGTTCCG	151
gi		145578045		gb		EF210299.1		TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAACATGCATGGTTCCG	151
gi		145578056		gb		EF210310.1		TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAACATGCATGGTTCCG	151
gi		145578061		gb		EF210315.1		TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATATTTTGAACATGCATGGTTCCG	151

gi		145578058		gb		EF210312.1		AAATTGAAAGGC-GGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCA	200
gi		145578057		gb		EF210311.1		AAATTGAAAGGC-GGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCA	200
gi		151940245		gb		AY461762.2		AAATTGAAAGGC-GGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCA	250
gi		151940244		gb		AY461761.2		AAATTGAAAGGC-GGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCA	250
gi		145578043		gb		EF210297.1		AAATTGAAAGGC-GGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCA	200
gi		145578045		gb		EF210299.1		AAATTGAAAGGC-GGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCA	200
gi		145578056		gb		EF210310.1		AAATTGAAAGGC-GGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCA	200
gi		145578061		gb		EF210315.1		AAATTGAAAGGC-GGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCA	200

222R 5' TCCATCCATAAGTGACAG 3'

gi		145578058		gb		EF210312.1		TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA	250
gi		145578057		gb		EF210311.1		TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA	250
gi		151940245		gb		AY461762.2		TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA	300
gi		151940244		gb		AY461761.2		TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA	300
gi		145578043		gb		EF210297.1		TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA	250
gi		145578045		gb		EF210299.1		TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA	250
gi		145578056		gb		EF210310.1		TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA	250
gi		145578061		gb		EF210315.1		TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA	250

gi		145578058		gb		EF210312.1		CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	300
gi		145578057		gb		EF210311.1		CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	300
gi		151940245		gb		AY461762.2		CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	350
gi		151940244		gb		AY461761.2		CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	350
gi		145578043		gb		EF210297.1		CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	300
gi		145578045		gb		EF210299.1		CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	300
gi		145578056		gb		EF210310.1		CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	300
gi		145578061		gb		EF210315.1		CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT	300

gi		145578058		gb		EF210312.1		ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA	350
gi		145578057		gb		EF210311.1		ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA	350
gi		151940245		gb		AY461762.2		ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA	400
gi		151940244		gb		AY461761.2		ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA	400
gi		145578043		gb		EF210297.1		ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA	350
gi		145578045		gb		EF210299.1		ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA	350
gi		145578056		gb		EF210310.1		ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA	350
gi		145578061		gb		EF210315.1		ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA	350

gi		145578058		gb		EF210312.1		GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTT	400
gi		145578057		gb		EF210311.1		GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTT	400
gi		151940245		gb		AY461762.2		GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTT	450
gi		151940244		gb		AY461761.2		GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTT	450
gi		145578043		gb		EF210297.1		GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTT	400
gi		145578045		gb		EF210299.1		GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTT	400
gi		145578056		gb		EF210310.1		GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTT	400
gi		145578061		gb		EF210315.1		GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTT	400

gi		145578058		gb		EF210312.1		AGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA	450
gi		145578057		gb		EF210311.1		AGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA	450

gi	151940245	gb	AY461762.2	AGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA	500
gi	151940244	gb	AY461761.2	AGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA	500
gi	145578043	gb	EF210297.1	AGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA	450
gi	145578045	gb	EF210299.1	AGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA	450
gi	145578056	gb	EF210310.1	AGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA	450
gi	145578061	gb	EF210315.1	AGGGAAGAATAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA	450

gi	145578058	gb	EF210312.1	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT	500
gi	145578057	gb	EF210311.1	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT	500
gi	151940245	gb	AY461762.2	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT	550
gi	151940244	gb	AY461761.2	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT	550
gi	145578043	gb	EF210297.1	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT	500
gi	145578045	gb	EF210299.1	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT	500
gi	145578056	gb	EF210310.1	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT	500
gi	145578061	gb	EF210315.1	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT	500

gi	145578058	gb	EF210312.1	GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	550
gi	145578057	gb	EF210311.1	GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	550
gi	151940245	gb	AY461762.2	GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	600
gi	151940244	gb	AY461761.2	GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	600
gi	145578043	gb	EF210297.1	GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	550
gi	145578045	gb	EF210299.1	GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	550
gi	145578056	gb	EF210310.1	GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	550
gi	145578061	gb	EF210315.1	GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC	550

gi	145578058	gb	EF210312.1	TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG-TGGAGGGTCATTGGAA	599
gi	145578057	gb	EF210311.1	TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG-TGGAGGGTCATTGGAA	599
gi	151940245	gb	AY461762.2	TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG-TGGAGGGTCATTGGAA	649
gi	151940244	gb	AY461761.2	TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG-TGGAGGGTCATTGGAA	650
gi	145578043	gb	EF210297.1	TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG-TGGAGGGTCATTGGAA	599
gi	145578045	gb	EF210299.1	TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG-TGGAGGGTCATTGGAA	599
gi	145578056	gb	EF210310.1	TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG-TGGAGGGTCATTGGAA	599
gi	145578061	gb	EF210315.1	TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG-TGGAGGGTCATTGGAA	599

gi	145578058	gb	EF210312.1	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT-AGCG	648
gi	145578057	gb	EF210311.1	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT-AGCG	648
gi	151940245	gb	AY461762.2	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT-AGCG	698
gi	151940244	gb	AY461761.2	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT-AGCG	700
gi	145578043	gb	EF210297.1	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT-AGCG	648
gi	145578045	gb	EF210299.1	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT-AGCG	648
gi	145578056	gb	EF210310.1	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT-AGCG	648
gi	145578061	gb	EF210315.1	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT-AGCG	648

gi	145578058	gb	EF210312.1	GTGAAATGCGTAGAGATAT-GGAGGAACACCAGTGG-CGAAGGCCACTTT	696
gi	145578057	gb	EF210311.1	GTGAAATGCGTAGAGATAT-GGAGGAACACCAGTGG-CGAAGGCCACTTT	696
gi	151940245	gb	AY461762.2	GTGAAATGCGTAGAGATAT-TGGAGGAACACCAGTGGGCGAAGGCCACTTT	748
gi	151940244	gb	AY461761.2	GTGAAATGCGTAGAGATAT-TGGAGGAACACCAGTGGGCGAAGGCCACTTT	750
gi	145578043	gb	EF210297.1	GTGAAATGCGTAGAGATAT-GGAGGAACACCAGTGG-CGAAGGCCACTTT	696
gi	145578045	gb	EF210299.1	GTGAAATGCGTAGAGATAT-GGAGGAACACCAGTGG-CGAAGGCCACTTT	696
gi	145578056	gb	EF210310.1	GTGAAATGCGTAGAGATAT-GGAGGAACACCAGTGG-CGAAGGCCACTTT	696
gi	145578061	gb	EF210315.1	GTGAAATGCGTAGAGATAT-GGAGGAACACCAGTGG-CGAAGGCCACTTT	696

gi	145578058	gb	EF210312.1	CT--GGTCTGTAACCTGACACTGAGG-CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	743
gi	145578057	gb	EF210311.1	CT--GGTCTGTAACCTGACACTGAGG-CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	743
gi	151940245	gb	AY461762.2	TCTGGGCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	798
gi	151940244	gb	AY461761.2	TTTTGGTCTGTAACCTGACACTGAGG-CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	799
gi	145578043	gb	EF210297.1	CT--GGTCTGTAACCTGACACTGAGG-CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	743
gi	145578045	gb	EF210299.1	CT--GGTCTGTAACCTGACACTGAGG-CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	743
gi	145578056	gb	EF210310.1	CT--GGTCTGTAACCTGACACTGAGG-CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	743
gi	145578061	gb	EF210315.1	CT--GGTCTGTAACCTGACACTGAGG-CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	743

gi	145578058	gb	EF210312.1	GA-TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC-GTAAACGATGAGTGCTAAGTGT	791
gi	145578057	gb	EF210311.1	GA-TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC-GTAAACGATGAGTGCTAAGTGT	791
gi	151940245	gb	AY461762.2	GAATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT	848

gi	151940244	gb	AY461761.2	GAATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCCTAAGTGT	849
gi	145578043	gb	EF210297.1	GA-TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC-GTAAACGATGAGTGCCTAAGTGT	791
gi	145578045	gb	EF210299.1	GA-TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC-GTAAACGATGAGTGCCTAAGTGT	791
gi	145578056	gb	EF210310.1	GA-TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC-GTAAACGATGAGTGCCTAAGTGT	791
gi	145578061	gb	EF210315.1	GA-TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC-GTAAACGATGAGTGCCTAAGCGT	791
				** ***** **	
gi	145578058	gb	EF210312.1	TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC	841
gi	145578057	gb	EF210311.1	TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC	841
gi	151940245	gb	AY461762.2	TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC	898
gi	151940244	gb	AY461761.2	TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC	899
gi	145578043	gb	EF210297.1	TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC	841
gi	145578045	gb	EF210299.1	TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC	841
gi	145578056	gb	EF210310.1	TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC	841
gi	145578061	gb	EF210315.1	TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC	841

gi	145578058	gb	EF210312.1	CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	891
gi	145578057	gb	EF210311.1	CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	891
gi	151940245	gb	AY461762.2	CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	948
gi	151940244	gb	AY461761.2	CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	949
gi	145578043	gb	EF210297.1	CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	891
gi	145578045	gb	EF210299.1	CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	891
gi	145578056	gb	EF210310.1	CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	891
gi	145578061	gb	EF210315.1	CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	891

gi	145578058	gb	EF210312.1	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTT	941
gi	145578057	gb	EF210311.1	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTT	941
gi	151940245	gb	AY461762.2	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTT	998
gi	151940244	gb	AY461761.2	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTT	999
gi	145578043	gb	EF210297.1	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTT	941
gi	145578045	gb	EF210299.1	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTT	941
gi	145578056	gb	EF210310.1	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTT	941
gi	145578061	gb	EF210315.1	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTT	941

gi	145578058	gb	EF210312.1	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG	991
gi	145578057	gb	EF210311.1	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG	991
gi	151940245	gb	AY461762.2	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG	1048
gi	151940244	gb	AY461761.2	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG	1049
gi	145578043	gb	EF210297.1	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG	991
gi	145578045	gb	EF210299.1	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG	991
gi	145578056	gb	EF210310.1	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG	991
gi	145578061	gb	EF210315.1	ACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG	991

gi	145578058	gb	EF210312.1	GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAG	1041
gi	145578057	gb	EF210311.1	GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAG	1041
gi	151940245	gb	AY461762.2	GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAG	1098
gi	151940244	gb	AY461761.2	GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAG	1099
gi	145578043	gb	EF210297.1	GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAG	1041
gi	145578045	gb	EF210299.1	GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAG	1041
gi	145578056	gb	EF210310.1	GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAG	1041
gi	145578061	gb	EF210315.1	GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGAG	1041

gi	145578058	gb	EF210312.1	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC	1091
gi	145578057	gb	EF210311.1	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC	1091
gi	151940245	gb	AY461762.2	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC	1148
gi	151940244	gb	AY461761.2	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC	1149
gi	145578043	gb	EF210297.1	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC	1091
gi	145578045	gb	EF210299.1	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC	1091
gi	145578056	gb	EF210310.1	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC	1091
gi	145578061	gb	EF210315.1	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC	1091

gi	145578058	gb	EF210312.1	ATTAAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT	1141
gi	145578057	gb	EF210311.1	ATTAAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT	1141
gi	151940245	gb	AY461762.2	ATTAAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT	1198
gi	151940244	gb	AY461761.2	ATTAAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT	1199

gi	145578043	gb	EF210297.1	ATTAAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT	1141
gi	145578045	gb	EF210299.1	ATTAAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT	1141
gi	145578056	gb	EF210310.1	ATTAAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT	1141
gi	145578061	gb	EF210315.1	ATTAAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT	1141

gi	145578058	gb	EF210312.1	GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG	1191
gi	145578057	gb	EF210311.1	GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG	1191
gi	151940245	gb	AY461762.2	GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG	1248
gi	151940244	gb	AY461761.2	GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG	1249
gi	145578043	gb	EF210297.1	GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG	1191
gi	145578045	gb	EF210299.1	GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG	1191
gi	145578056	gb	EF210310.1	GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG	1191
gi	145578061	gb	EF210315.1	GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG	1191

gi	145578058	gb	EF210312.1	CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCT	1241
gi	145578057	gb	EF210311.1	CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCT	1241
gi	151940245	gb	AY461762.2	CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCT	1298
gi	151940244	gb	AY461761.2	CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCT	1299
gi	145578043	gb	EF210297.1	CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCT	1241
gi	145578045	gb	EF210299.1	CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCT	1241
gi	145578056	gb	EF210310.1	CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCT	1241
gi	145578061	gb	EF210315.1	CTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCT	1241

gi	145578058	gb	EF210312.1	CATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA	1291
gi	145578057	gb	EF210311.1	CATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA	1291
gi	151940245	gb	AY461762.2	CATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA	1348
gi	151940244	gb	AY461761.2	CATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA	1349
gi	145578043	gb	EF210297.1	CATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA	1291
gi	145578045	gb	EF210299.1	CATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA	1291
gi	145578056	gb	EF210310.1	CATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA	1291
gi	145578061	gb	EF210315.1	CATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA	1291

gi	145578058	gb	EF210312.1	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC	1341
gi	145578057	gb	EF210311.1	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC	1341
gi	151940245	gb	AY461762.2	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC	1398
gi	151940244	gb	AY461761.2	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC	1399
gi	145578043	gb	EF210297.1	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC	1341
gi	145578045	gb	EF210299.1	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC	1341
gi	145578056	gb	EF210310.1	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC	1341
gi	145578061	gb	EF210315.1	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC	1341

gi	145578058	gb	EF210312.1	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA	1391
gi	145578057	gb	EF210311.1	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA	1391
gi	151940245	gb	AY461762.2	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA	1448
gi	151940244	gb	AY461761.2	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA	1449
gi	145578043	gb	EF210297.1	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA	1391
gi	145578045	gb	EF210299.1	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA	1391
gi	145578056	gb	EF210310.1	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA	1391
gi	145578061	gb	EF210315.1	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA	1391

gi	145578058	gb	EF210312.1	AGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG	1441
gi	145578057	gb	EF210311.1	AGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG	1441
gi	151940245	gb	AY461762.2	AGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG	1498
gi	151940244	gb	AY461761.2	AGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG	1499
gi	145578043	gb	EF210297.1	AGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG	1441
gi	145578045	gb	EF210299.1	AGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG	1441
gi	145578056	gb	EF210310.1	AGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG	1441
gi	145578061	gb	EF210315.1	AGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG	1441

gi	145578058	gb	EF210312.1	ATTGGGGTGAAGTCGTAACA-----	1461
gi	145578057	gb	EF210311.1	ATTGGGGTGAAGTCGTAACA-----	1461
gi	151940245	gb	AY461762.2	ATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA	1523
gi	151940244	gb	AY461761.2	ATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA	1524
gi	145578043	gb	EF210297.1	ATTGGGGTGAAGTCGTAACA-----	1461


```

gi | 145578045 | gb | EF210299.1 | ATTGGGGTGAAGTCGTAACA----- 1461
gi | 145578056 | gb | EF210310.1 | ATTGGGGTGAAGTCGTAACA----- 1461
gi | 145578061 | gb | EF210315.1 | ATTGGGGTGAAGTCGTAACA----- 1461
*****

```

4. Se diseñarán los iniciadores o primers en las primeras 200 pb (pares de bases) para amplificar la región del 16S con mayores diferencias en secuencia entre serovares.

Diseño de los iniciadores para que éstos sean pedidos

222R **5'TCCATCCATAAGTGACAG 3'** con una temperatura media (T_m) aproximada de acuerdo a la ecuación:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C) = 2(6+4) + 4(3+5) = 52^\circ C$$

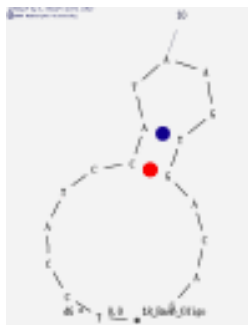
50 F **5'ACATGCAAGTCGAGCGAAT 3'** con una temperatura media (T_m) aproximada de acuerdo a la ecuación:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C) = 2(7+3) + 4(3+4) = 56^\circ C$$

Cebador	Heterodímero (# de nucleótidos)	Homodímero	Gancho de Pelo o Hairpin
222R	versus 50F = -3.43 (3)	-1.95 (3)	0.04
50F		-7.05 (4)	0.25

222R

Heterodímero



ΔG	0.04	kcal.mol ⁻¹
T_M	25.0	°C
ΔH	-18.5	kcal.mol ⁻¹
ΔS	-62	cal.K ⁻¹ .mol ⁻¹

Homodímero

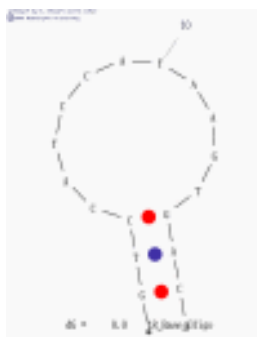
Delta G	-1.95 kcal/mol
Pares de Bases	2
5'	TCCATCCATAAGTGACAG

|| :: ::
 3' GACAGTGAATACCTACCT

Heterodimer 222R versus 50F

Delta G	-3.43 kcal/mol
Pares de Bases	3
5' TCCATCCATAAGTGACAG	
:	
3' TAAGCGAGCTGAACGTACA	

222R



ΔG	-0.01	kcal.mol ⁻¹
T _M	25.0	°C
ΔH	-24.9	kcal.mol ⁻¹
ΔS	-83.5	cal.K ⁻¹ .mol ⁻¹

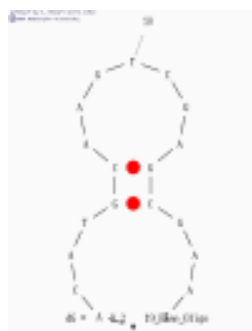
Heterodímero con 50F

Delta G	-3.43 kcal/mol
Pares de Bases	3
5' GTCCATCCATAAGTGACA	
:	
3' TAAGCGAGCTGAACGTACA	

Homodímero

Delta G	-2.92 kcal/mol
Pares de Bases	3
5' GTCCATCCATAAGTGACA	
: : ::	
3' ACAGTGAATACCTACCTG	

50F

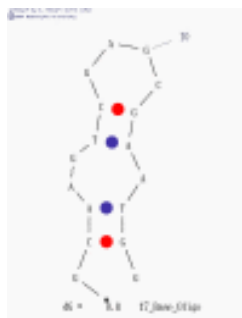


ΔG	0.25	kcal.mol ⁻¹
T_M	20.7	°C
ΔH	-20.7	kcal.mol ⁻¹
ΔS	-70.4	cal.K ⁻¹ mol ⁻¹

Homodímero

Delta G	-7.05 kcal/mol
Pares de Bases	4
5'	ACATGCAAGTCGAGCGAAT
	:: ::
3'	TAAGCGAGCTGAACGTACA

50F



ΔG	0.76	kcal.mol ⁻¹
T_M	18.6	°C
ΔH	-36.7	kcal.mol ⁻¹
ΔS	-125.8	cal.K ⁻¹ mol ⁻¹

Homodímero

Delta G	-6.76 kcal/mol
Pares de Bases	4
5'	GCAAGTCGAGCGAATGG
3'	GGTAAGCGAGCTGAACG

Heterodímero con 222R

Delta G	-6.5 kcal/mol
Pares de Bases	4
5' GCAAGTCGAGCGAATGG	
: :	
3' GACAGTGAATACCTACCT	

Se realizó una búsqueda en Blast²² de los primers 50F y 222R contra *B. thuringiensis* la cual mostró una coincidencia del 100% con la misma puntuación para múltiples serovares 16S, en la misma región de la secuencia. Cuando se realizó la búsqueda en contra de *Bacillus* spp., mostró una coincidencia del 100% con la misma puntuación que *B. thuringiensis* y *B. cereus* más otros cuantas especies.

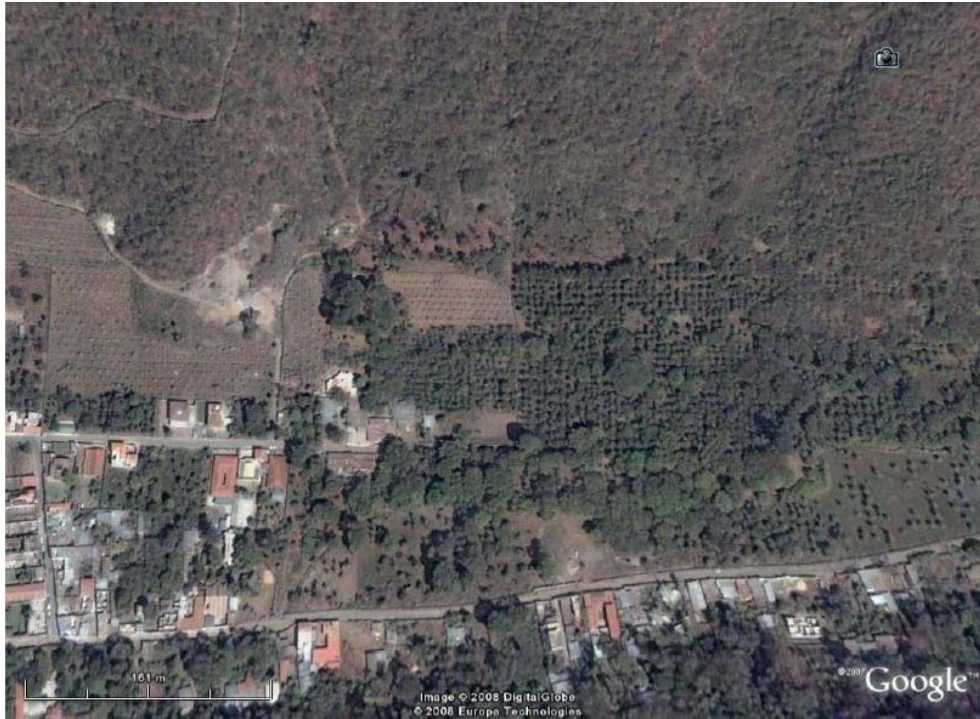
Conclusión: los iniciadores tiene una perfecta coincidencia con una región específica del 16S rDNA *Bacillus* spp. Los primers seleccionados son: **222R 5'TCCATCCATAAGTGACAG 3'** y **50 F 5'ACATGCAAGTCGAGCGAAT 3'**. Estos fueron seleccionados debido a sus bajas probabilidades de formar dímeros de iniciadores (primer dimmers), aunque el 50F puede tener una posible unión entre si mismo (self priming).

Información de las fincas escogidas para el estudio²³. Ambas fincas fueron escogidas debido a la disponibilidad de los dueños para permitir el ingreso a las mismas y tomar muestras.

Primer muestreo. Las coordenadas de la finca ubicada en la aldea Sta. Ana, municipio de Antigua Guatemala, departamento de Sacatepéquez son: 14°32'57.07" N – 90°43'11.92" O. Se escogió la región central del país debido a que se sabía que se ha utilizado Dipel® durante varios años y de ahí se genera la teoría de que se podría conocer con este estudio si éste se encuentra presente con una mayor probabilidad en esta región que además es un centro agrícola importante.

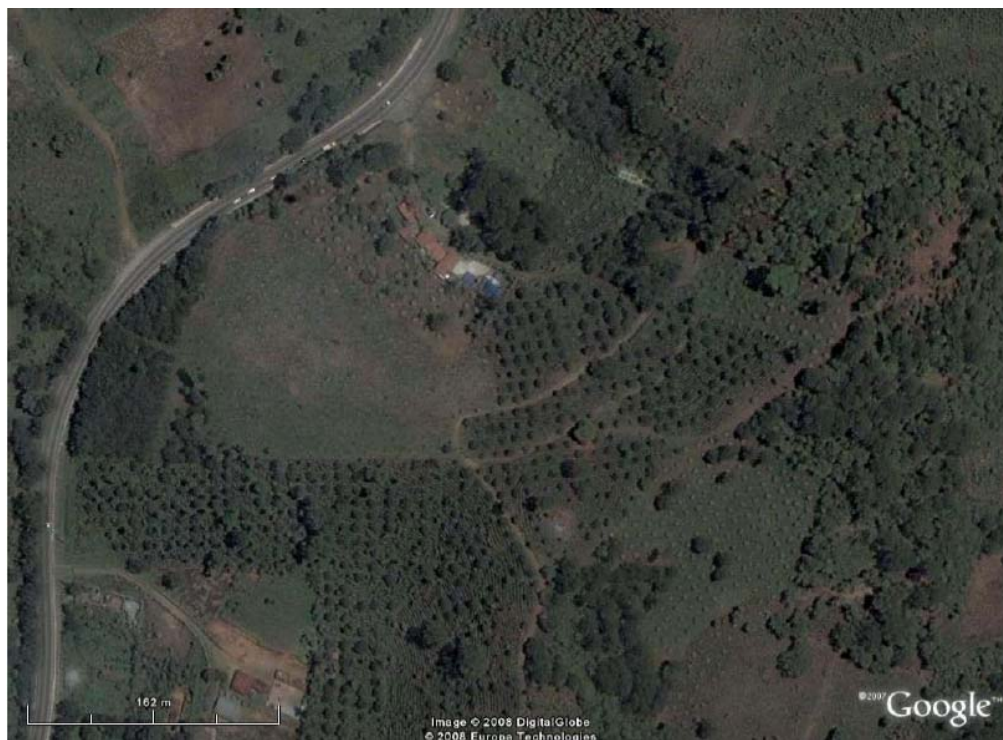
²² Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). Blast Genome. Visitada: 03/09/2007 Página Web: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tree.cgi

²³ Comunicación oral con el Ing. Luis Andrés Arévalo, Laboratorio de Entomología Aplicada del Centro de Estudios Agrícolas y Forestales, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala (UVG). Las imágenes de las fincas fueron obtenidas utilizando el programa en línea Google Earth y proporcionadas por el Ing. Arévalo.



Esta finca está ubicada en la región del Bosque Húmedo montano bajo (bh-MB). Esta finca colinda a un bosque y a una siembra de café.

Segundo muestreo. Las coordenadas de la Finca “Don Bosco” ubicada en Tac Tic, municipio de Alta Verapaz son $15^{\circ}24'7.68''$ N – $90^{\circ}24'25.98''$ O. Se escogió esta región del país debido a que se sabía que Dipel es un producto no utilizado o desconocido y de ahí se genera la teoría de que se podría conocer con este estudio si en este lugar se podrían encontrar presentes con una mayor probabilidad en esta región presuntas cepas nativas de *B. thuringiensis* debido a que en esta región la agricultura no tiene un gran impacto como en la región central.



Esta finca está ubicada en la región del Bosque Muy Húmedo subtropical frío (bmh-S(f)). Esta finca es colindante con un bosque y una siembra de macadamia.