



Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

“Identificación molecular de serovares de *Bacillus thuringiensis* de cepas aisladas de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca, México”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

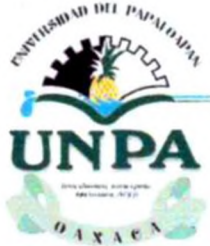
PRESENTA:

LORENA OMEGA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

Director: Dr. Miguel Ángel Peña Rico

Co-Director: Dr. Genaro Vázquez Victorio

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, MÉXICO, 2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 06 de marzo de 2019 a las 12 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Identificación molecular de serovares de *Bacillus thuringiensis* de cepas aisladas de la Cuenca del Papaloapan**" presentada por la alumna Lorena Omega Martínez Hernández, con número de matrícula 13090221, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 06 de marzo de 2019


ATENTAMENTE LA COMISIÓN REVISORA



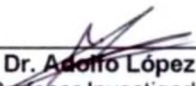
Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



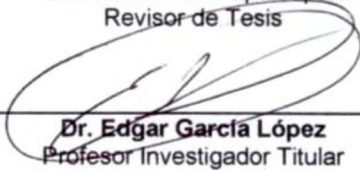
Dr. Enrique Villalobos Amador
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



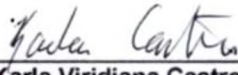
Dr. Octavio Silva García
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



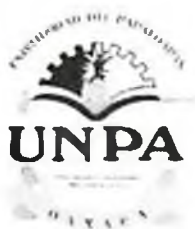
Dr. Adolfo López Torres
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Edgar García López
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 08 de febrero de 2019
Oficio No. JCIB/003/03/2019

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Lorena Omega Martínez Hernández** titulado "Identificación molecular de serovares de *Bacillus thuringiensis* de cepas aisladas de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca, México". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Presidente: Dr. Enrique Villalobos Amador
Secretario: Dr. Edgar García López
Vocal: Dr. Octavio Silva García
Primer Suplente: Dr. Adolfo López Torres
Segundo Suplente: Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bau Lo-tama, chí ji jú



Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



c.c.p. Dr. Miguel Ángel Peña Rico, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Lorena Omega Martínez Hernández, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Agradecimientos

A mi director de tesis, **Dr. Miguel Ángel Peña Rico**, por haberme brindado todos los elementos necesarios para concluir con este proyecto importante en mi carrera profesional.

Sinceramente, a todos los profesores de los cuales recibí asesoramiento incondicional y que aportaron de manera significativa a este trabajo: **Dr. Julián Mario Peña Castro, Dr. Edgar García López, Dr. Adolfo López Torres, Dr. Enrique Villalobos Amador y Dr. Octavio Silva García**. A la **Dra. Ana Karin Navarro Martínez**, por permitirme colaborar y pertenecer al grupo de investigación, del cual adquirí importantes habilidades técnicas y de trabajo científico durante la realización de este proyecto.

Al **Dr. Genaro Vázquez Victorio y Dr. Mathieu Hautefeuille** por brindarnos las puertas abiertas y permitirnos colaborar en el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para el Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) de la UNAM.

Con mucho cariño, a toda mi familia que me apoyó y acompañó durante el trayecto de mi carrera profesional: **mis padres: Rubén y Araceli, mis hermanas: Alfa y Rubí; mi tío Roberto Hernández Torres**.

A mis compañeros del grupo de investigación, **Karen, Alain y Manzano**, por su apoyo y por los buenos *playlist* en el laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiamiento otorgado bajo el proyecto denominado: **CB-CONACyT 2015 número 258587**.

Dedicatoria

*A mi madre **Araceli**, por ser el soporte que me mantiene firme, por estar conmigo siempre, por acompañarme en mi felicidad, en mis malos momentos y por ayudarme a enfrentar los obstáculos; pero sobretodo, por su amor incondicional.*

*A mis hermanas **Alfa y Rubí**, no importa lo que suceda, siempre estaré con ustedes. Las quiero mucho.*

Contenido

Índice de figuras	IX
Índice de tablas.....	XI
Abreviaturas	XII
Resumen.....	XIII
Abstract	XIV
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	4
2.1 Inclusiones cristalinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	4
2.1.1 Proteínas Cry.....	4
2.1.2 Mecanismo de acción de las proteínas Cry	6
2.1.3 Parasporinas.....	7
2.1.4 Mecanismo de acción de las parasporinas	10
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> y su importancia en la biotecnología	13
2.2.1 Bioinsecticidas y control de plagas	13
2.2.2 Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas.....	14
2.3 Identificación de serovares de <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	16
2.3.1 Técnicas de identificación molecular de <i>Bt</i> acoplados a análisis bioinformáticos	16
3 JUSTIFICACIÓN	22
4 HIPÓTESIS.....	23
5 OBJETIVOS.....	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos secundarios	24
6 MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Cultivo bacteriano.....	26

- 6.2 Extracción de DNA genómico..... 26
- 6.3 Análisis bioinformático y amplificación por PCR..... 27
- 6.4 Purificación de productos de PCR 28
- 6.5 Construcción del árbol filogenético..... 28
- 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 30
 - 7.1 Extracción de DNA genómico..... 30
 - 7.2 Análisis bioinformático..... 31
 - 7.3 Amplificación por PCR 34
 - 7.3.1 Gen *16S rRNA*..... 35
 - 7.3.2 Gen *gmk*..... 35
 - 7.4 Purificación y secuenciación 36
 - 7.5 Árboles filogenéticos..... 38
- 8 CONCLUSIÓN 49
- 9 PERSPECTIVAS 50
- 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51
- 11 ANEXOS 56
 - 11.1 Amplificación del gen *aroE* 56

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
Figura 2. Estructura secundaria de la proteína Cry8Ea.	5
Figura 3. Mecanismo de acción de las proteínas Cry en insectos.....	7
Figura 4. Filograma de parasporinas.	9
Figura 5. Estructura secundaria de la parasporina PS1Aa1 en su forma activa.	10
Figura 6. Efecto citotóxico de una proteína parasporal (forma activa en 30 kDa y proveniente de la cepa <i>Bt</i> A1547) en células HL60.	12
Figura 7. Inmunofluorescencia de la α -tubulina y los filamentos de actina en células HepG2 tratadas con parasporina-2 que permite evaluar los cambios estructurales del citoesqueleto.....	12
Figura 8. Análisis inmunohistoquímicos de parasporina-2 demostrando su especificidad en tejido de cáncer hepático.....	15
Figura 9. Esquema general de un ciclo completo de PCR.....	17
Figura 10. Secuenciación por el método de Sanger.....	19
Figura 11. Alineamiento de la secuencia variable de la región V1 de <i>16S rRNA</i> de <i>B. cereus</i> , <i>B. mycooides</i> y <i>Bt</i>	19
Figura 12. Árbol filogenético de FFP.....	20
Figura 13. Árbol filogenético de 199 ST asignadas para 233 cepas de <i>Bt</i>	21
Figura 14. Esquema general de la metodología para la identificación molecular de <i>Bt</i>	25
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 3% de gDNA de cepas de <i>Bt</i>	30
Figura 16. Alineamiento de los oligonucleótidos de <i>16S rRNA</i> en secuencias de referencia.....	32
Figura 17. PCR <i>in silico</i> del gen <i>16S rRNA</i>	33
Figura 18. Alineamiento de los oligonucleótidos de <i>gmk</i> en <i>Bt</i> serovar <i>konkukian</i> cepa 97-27.....	34

Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de la amplificación por PCR del gen <i>16S rRNA</i>	35
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de la amplificación por PCR del gen <i>gmk</i> en relación con el marcador de tamaño molecular.....	36
Figura 21. Geles de agarosa 3% con bandas amplificadas de genes previos a la purificación.....	37
Figura 22. Electroferograma de la cepa AC2 del gen <i>16S rRNA</i>	39
Figura 23. Secuencias consenso seleccionadas después del alineamiento múltiple de las cepas IB81, AX, AC5 y AC2 del gen <i>16S rRNA</i>	40
Figura 24. Secuencias consenso de las secuencias de referencia de especies de <i>Bacillus</i>	40
Figura 25. Alineamiento múltiple de secuencias consenso de las cepas aisladas y cepas de referencia de las bases de datos.	41
Figura 26. Árbol filogenético original de secuencias de <i>16S rRNA</i> del género <i>Bacillus</i> y cepas de <i>Bt</i> aisladas.....	42
Figura 27. Árbol filogenético de consenso bootstrap de secuencias de <i>16S rRNA</i> del género <i>Bacillus</i> y cepas de <i>Bt</i> aisladas.....	43
Figura 28. Árbol filogenético original de secuencias de <i>gmk</i> de serovares y cepas de <i>Bt</i> contra cepas de <i>Bt</i> aisladas.....	47
Figura 29. Árbol filogenético de consenso bootstrap de secuencias de <i>gmk</i> de serovares y cepas de <i>Bt</i> contra cepas de <i>Bt</i> aisladas.....	48
Figura 30. Alineamiento de los oligonucleótidos de <i>aroE</i> en secuencias de referencia.....	56
Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de la amplificación por PCR del gen <i>aroE</i>	57
Figura 32. Electroferograma de la cepa IB81 del gen <i>aroE</i>	58

Índice de tablas

Tabla 1. Familia de insectos susceptibles a grupos diferentes de proteínas Cry.....	4
Tabla 3. Condiciones de reacción de PCR para los genes <i>16S rRNA</i> y <i>gmk</i>	27
Tabla 4. Cuantificación de gDNA de las cepas seleccionadas de <i>Bt</i>	31
Tabla 5. Cuantificación de DNA purificado del producto de amplificación de los genes <i>16S rRNA</i> y <i>gmk</i> en cepas de <i>Bt</i>	38
Tabla 6. Serovares y cepas de <i>Bt</i> publicadas en NCBI	44
Tabla 7. Condiciones de reacción de PCR del gen <i>aroE</i>	57
Tabla 8. Cuantificación de DNA purificado del gen <i>aroE</i>	57

Abreviaturas

μL: Microlitro

β-TFP: Beta formadora de poros

°C: Grados centígrados

A: Absorbancia

AFPF: Fragmentos de polimorfismos de genes de flagelina

APN: Aminopeptidasa-N

B: *Bacillus*

BGSC: *Bacillus* Genetic Stock Center

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Bt: *Bacillus thuringiensis*

Ca: Calcio

Ctrl: Control

ddNTPs: Dideoxinucleótidos trifosfatados

DNA: Ácido desoxirribonucleico

gDNA: Ácido desoxirribonucleico genómico

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FFP: Frecuencia de perfiles de características

g: Gravedades

h: Hora

HCl: Ácido clorhídrico

IEBC: International Entomopathogenic *Bacillus* Center

kb: Kilobases

kDa: KiloDalton

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

min: minutos

mL: Mililitro

MLST: Tipificación multilocus de secuencias

mM: Milimolar

MPM: Marcador de tamaño molecular

NaCl: Cloruro de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: Nanogramos

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

pmol: Picomol

PS: Parasporina

RDP: Ribosomal Data Project

rpm: Revoluciones por minuto

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

s: segundos

SDS: Dodecil sulfato de sodio

ST: Secuencias tipo

Str: cepa

Tris: Tris-hidroximetil-aminometano

V: Volt

Resumen

Bacillus thuringiensis (*Bt*) en su fase de esporulación sintetiza proteínas cristalinas con diferentes actividades biológicas: proteínas Cry con actividad insecticida y parasporinas que han demostrado tener actividad citotóxica contra células de diversos tipos de cáncer humano. Actualmente, se han logrado clasificar 78 serovares de *Bt* provenientes de 158 cepas del *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC). En la Cuenca del Papaloapan, se han aislado cepas de *Bt* productoras de proteínas cristalinas. Para clasificarlas se ha empleado al gen *16S rRNA*; sin embargo, este no genera un poder de discriminación suficiente para lograr identificar a nivel de serovar. Por ello, es necesario el uso de otros genes altamente conservados como *gmk*, *rpoB*, *gyrB*, *pta* y *aroE*, que en combinación, permitan aumentar el poder de discriminación para identificar filogenéticamente serovares de *Bt* productoras de proteínas de gran interés biológico.

El objetivo de este trabajo fue identificar molecularmente los serovares de *Bt* de cepas aisladas de la Cuenca del Papaloapan para la construcción de árboles filogenéticos empleando los genes *16S rRNA* y *gmk*. Para ello, se realizaron cultivos líquidos de 10 cepas de *Bt* en caldo nutritivo y a la biomasa generada se le extrajo el DNA para utilizarlos como templado en la amplificación de los genes por PCR de punto final. Los productos amplificados se purificaron y se secuenciaron por electroforesis capilar basada en Sanger. Las secuencias obtenidas se analizaron en las bases de datos bioinformáticas del NCBI y el software MEGA-X para la construcción de los árboles filogenéticos.

Como resultados, se obtuvo que el gen *16S rRNA* no logró una discriminación suficiente para identificar serovares de *Bt*; no obstante, el gen *gmk* mostró mayor poder de discriminación, logrando identificar de forma directa a las cepas AC3, IB81 y HD73 como *Bt* str. XL6, *Bt* MC28 y *Bt* C15 (proveniente del serovar *kurstaki* str. HD73), respectivamente. Las cepas restantes (AX, HD1, AC5, A10, A5 y A24) se mantuvieron como un grupo independiente, el cual proviene de A34 como ancestro en común; a su vez, esta cepa mostró la posibilidad de tener una relación filogenética con cualquiera de las variedades del grupo de *Bt* serovar *tolworthi*.

Palabras clave: *Bt*, serovar, árbol filogenético.

Abstract

Bacillus thuringiensis (*Bt*) in the sporulation phase forms a crystal proteins, which a different biological activities: Cry proteins with insecticidal activity and parasporins that have been shown to have cytotoxic activity against cells of various types of human cancer. Currently, 78 *Bt* serovars from 158 strains of the *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC) have been classified. In Cuenca del Papaloapan, strains of *Bt* producing crystal proteins have been isolated. To classify them, has used the *16S rRNA* gene; however, it does not generate a lot of discrimination power to serovar level. Therefore, it is necessary to use other highly conserved genes such as *gmk*, *rpoB*, *gyrB*, *pta* and *aroE*, to identify phylogenetically serovars of *Bt* that produce proteins of great biological interest.

The aim of this work was to identify the serovars *Bt* strains isolated of Cuenca del Papaloapan by the construction of phylogenetic trees using the *16S rRNA* and *gmk* genes. Liquid cultures of 10 strains of *Bt* were made in nutritious broth and the biomass generated was used extracted from the DNA which employed as a template in the amplification of the genes by end-point PCR. The amplicons were purified and sequenced by capillary electrophoresis based on Sanger method. The sequences were analyzed by NCBI bioinformatics databases and the MEGA-X software for the construction of phylogenetic trees.

The results point outed that the *16S rRNA* gene did not achieve sufficient discrimination to identify *Bt* serovars. However, the *gmk* gene showed greater discrimination power, being able to directly identify strains AC3, IB81 and HD73 as *Bt* str. XL6, *Bt* MC28 and *Bt* C15 (from serovar *kurstaki* str.HD73), respectively. The remaining strains (AX, HD1, AC5, A10, A5 and A24) were kept as an independent group, which comes from A34 as ancestor in common; In turn, this strain showed the possibility of having a phylogenetic relationship with any of the varieties of the *Bt* serovar *tolworthi* group.

Keywords: *Bt*, serovar, phylogenetic tree

1 Introducción

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria con morfología de bacilo, gram positiva, anaerobia facultativa y entomopatógena (Sneath y Holt, 1986), que en su fase de esporulación tiene la capacidad de formar inclusiones parasporales formadas por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para algunos insectos (Figura 1), principalmente pertenecientes al género Lepidóptera, Coleóptera y Díptera (Höfte y Whiteley, 1989; Glare y O'Callaghan, 2000). Estas proteínas son conocidas como proteínas cristal con actividad insecticida o δ -endotoxinas, denominadas Cry (45-160 kDa) y proteínas con actividad hemolítica, denominadas Cyt (22-33 kDa) (Beegle y Yamamoto, 1992). Un tercer tipo de proteínas cristalinas no poseen actividad insecticida, pero sí actividad citotóxica contra algunas líneas celulares de cáncer humano, las cuales se han denominado parasporinas (Mizuki *et al.*, 2000).



Figura 1. *Bacillus thuringiensis*. Micrografía en microscopio electrónico de transmisión, donde se observa la formación de un cuerpo cristalino y de una espora (Tomada de Sanchis *et al.*, 2010).

Bt pertenece a la familia *Bacillaceae* y forma parte del grupo de *Bacillus cereus sensu lato* que incluye a otros seis grupos que están estrechamente relacionados: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. citotoxicus* y *B. weihenstephanensis* (Drewnowska e Izabela, 2013). Particularmente, *Bt*, *B. cereus* y *B. anthracis*, a pesar de que presentan características

fenotípicas y efectos patológicos muy diferentes (Helgason *et al.*, 2000), mantienen una relación genética muy cercana y se han propuesto como miembros de una misma especie dentro del grupo de *B. cereus* (Chen y Tsen, 2002).

La característica principal que distingue a *Bt* de las especies anteriormente mencionadas, es la presencia de cuerpos cristalinos en la fase de esporulación (Cerón, 2004). Desde el siglo pasado, se ha observado que variedades de cepas de *Bt* producen cristales característicos con actividad insecticida y citotóxica. Su clasificación permite detectar y caracterizar nuevas cepas que expresen actividades biológicas distintas. A su vez, esta clasificación origina un listado de serovares con alto porcentaje de homología permitiendo diferenciar a esta bacteria a nivel de subespecie (Ryan *et al.*, 2010).

Técnicas como la microscopía y serotipado de antígeno H flagelar se habían establecido como métodos de elección para la clasificación de diversas cepas de *Bt* (de Barjac y Bonnefoi, 1962). No obstante, estos métodos están limitados en su capacidad de distinguir y discriminar a nivel subespecie a cepas del mismo serovar. Debido a esto, surge la necesidad de implementar métodos más confiables y con alta sensibilidad a través de técnicas moleculares para identificar y caracterizar nuevas cepas de *Bt* con actividades insecticida, hemolítica o citotóxica. Aunado a esto, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica molecular altamente sensible que permite la amplificación *in vitro* de un fragmento específico de DNA (Jordan *et al.*, 2001). Con el empleo de genes altamente conservados (constitutivos o de mantenimiento) como *16S rRNA*, *23S rRNA*, *aroE*, *rpoB*, *gyrB* y *gmk*, en conjunto con las bases de datos y herramientas bioinformáticas, tales como el National Center for Biotechnology Information (NCBI) es posible realizar una amplia discriminación entre serovares de distintas cepas de *Bt* (Woese, 1987; Yamamoto y Harayama, 1995; Soufiane y Côté, 2008; Wang *et al.*, 2018).

Hasta el momento, se ha realizado una caracterización e identificación filogenética de 73 serovares de 158 cepas provenientes del catálogo de cepas del *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC) a través de la construcción de árboles filogenéticos, proporcionando información respecto a la correlación de sus porcentajes de homología y cambios evolutivos entre cada uno de ellos (Wang *et al.*, 2018).

En la región del Papaloapan, Oaxaca, México, se han aislado y caracterizado cepas de *Bt* productoras de proteínas Cry, empleando el gen *16S rRNA* para la construcción de árboles filogenéticos en conjuntos con herramientas bioinformáticas (Cruz-Nolasco, 2014). Sin embargo, debido a que *16S rRNA* es un gen constitutivo universal de procariotes (Woese, 1987), se busca como alternativa el aprovechamiento de otros genes que sean altamente conservados que permitan identificar y discriminar a los distintos serovares de cada una de las cepas aisladas de la región, apoyándose de las bases de datos y herramientas bioinformáticas. Es por ello que en este trabajo se proponen a los genes *16S rRNA* (como identificador estándar) y *gmk* (Wang *et al.*, 2018), por su naturaleza constitutiva y continua expresión en la célula, como marcadores ideales para la caracterización e identificación molecular de cepas de *Bt* aisladas de la Cuenca del Papaloapan, empleando la técnica de PCR de punto final, bases de datos del NCBI y el programa MEGA-X para establecer relaciones filogenéticas entre serovares.

2 Antecedentes

2.1 Inclusiones cristalinas de *Bacillus thuringiensis*

2.1.1 Proteínas Cry

En 1989, se propuso una nomenclatura y clasificación de las proteínas Cry basados en la similitud de su secuencia de aminoácidos y el rango de especificidad (Höfte y Whiteley, 1989). Casi una década más tarde, se estableció una nueva clasificación basada solamente en la similitud de las secuencias primarias entre las proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998). Actualmente, estas proteínas se encuentran distribuidas en 50 grupos y varios subgrupos; en cambio, las proteínas Cyt se dividen en dos grandes grupos y varios subgrupos. Cada tipo de proteína presenta una especificidad muy grande hacia diferentes familias de insectos (Tabla 1): lepidópteros (Cry1, Cry2 y Cry9), coleópteros (Cry3, Cry7 y Cry8), dípteros (Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19) y con actividad nematocida (Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14) (Crickmore, 1998).

Tabla 1. Familia de insectos susceptible a grupos diferentes de proteínas Cry (Basada en Crickmore, 1998)

Toxina	Insectos diana	Ejemplos
Cry1, Cry 2, Cry 9	Lepidópteros	Mariposas y polillas <i>Abraxas sylvata</i> Scopoli <i>Acherontia atropos</i> <i>Aglais urticae</i> <i>Aspitates ochrearia</i> 
Cry 3, Cry 7, Cry 8	Coleópteros	Escarabajos <i>Lamprima aurata</i> <i>Dynastinae megasomas</i> <i>Rhinotia hemistictus</i> <i>Chondropyga dorsalis</i> <i>Amblytelus sp.</i> 
Cry 2, Cry 4, Cry 10, Cry 11, Cry 16, Cry 17, Cry 19	Dípteros	Moscas y mosquitos <i>Gauromydas heros</i> <i>Ceratitis capitata</i> <i>Anopheles gambiae</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Aedes aegypti</i> 
Cry 5, Cry 12, Cry 13, Cry 14	Nemátodos	Gusanos <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Dracunculus medinensis</i> <i>Strongyloides stercoralis</i> 

Las estructuras cristalinas de las diferentes toxinas Cry divididos en los subgrupos Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea1, tienen patrones de plegado similares con tres dominios distintos. El dominio I es un paquete de siete a ocho hélices α formado por algunas de carácter anfipático y una hidrofóbica central α -5 (Bravo *et al*, 2013). Este dominio está involucrado en la inserción a la membrana y la formación de poros en el epitelio del intestino medio del insecto diana, se sugiere que es por la presencia de sus largas hélices hidrofóbicas y anfipáticas (Deist, 2014). El dominio II consiste en tres láminas β antiparalelas con regiones de bucle expuestas que están implicadas en la interacción con receptores, mientras que el dominio III es un β -sándwich de dos hojas β antiparalelas involucradas en la unión de un receptor celular y posiblemente en la inserción a la membrana (Figura 2).

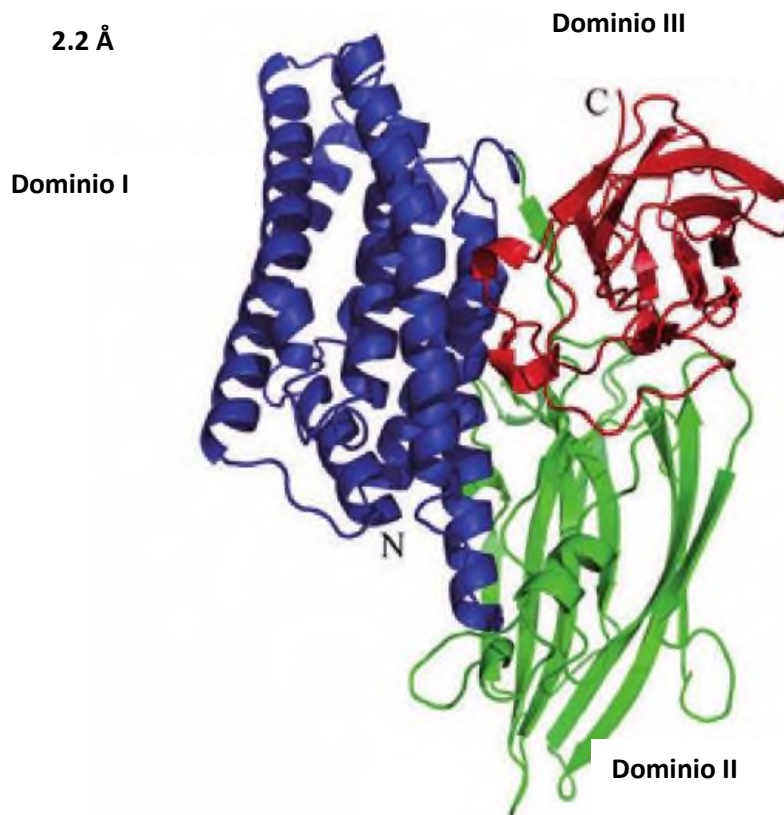


Figura 2. Estructura secundaria de la proteína Cry. Se muestran de diferentes colores azul, verde y rojo, los tres dominios I, II y III involucrados en la actividad tóxica, respectivamente. (Tomada y modificada de Protein Data Bank, código: 3EB7).

2.1.2 Mecanismo de acción de las proteínas Cry

Para que confieran su actividad insecticida, las proteínas Cry de 3 dominios necesitan estar en un ambiente reductor que desestabilice los puentes disulfuro y puedan ser activadas como toxina (Choma y Kaplan, 1992). Cuando el insecto ingiere a la bacteria con el cristal y la espora, dependiendo de la naturaleza de la proteína, se realiza la solubilización a pH alcalino en el ambiente reductor del intestino medio del insecto, que en conjunto con la acción de proteasas, dará lugar a la liberación de fragmentos de aminoácidos de la región *N*-terminal y del extremo *C*-terminal, dejando una toxina activa de 49 a 70 kDa (Tiewisiri y Angsuthanasombat, 2007). Una vez liberada la toxina, esta se une a sus moléculas diana específicas como las cadherinas, aminopeptidasas N (APN), fosfatasa alcalina y proteínas de 210 kDa presentes en la membrana epitelial del intestino (Galistskt *et al.*, 2001), dando lugar a la formación de canales de iones o poros de 1 a 2 nm en la membrana, aumentando la permeabilidad y permitiendo la entrada de moléculas de agua, iones y otras moléculas de alto peso molecular que alteran las condiciones internas de las células, lo que conduce a la destrucción del epitelio intestinal (Bravo *et al.*, 2013), ocasionando parálisis del intestino, vómito, diarrea, descompensación osmótica, parálisis total y finalmente la muerte del insecto (Aronson y Shai, 2001; Vachon *et al.*, 2012). En la Figura 3 se describen las etapas del mecanismo de acción de las proteínas Cry en el insecto.

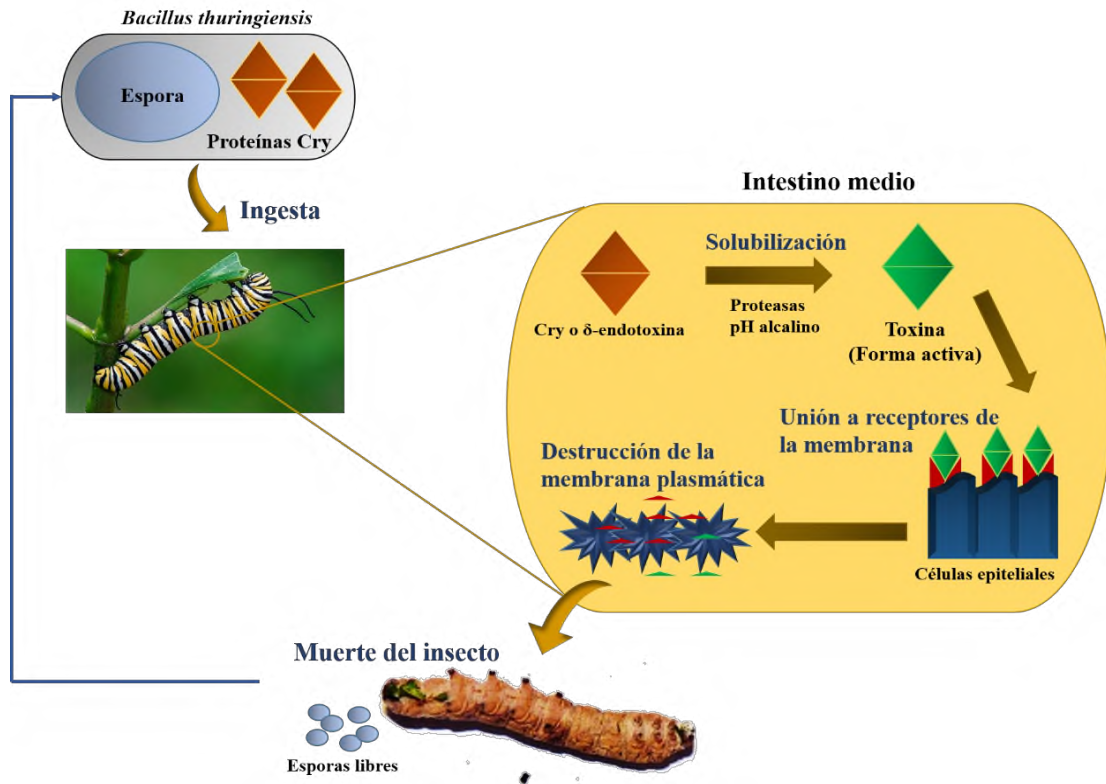


Figura 3. Mecanismo de acción de las proteínas Cry en insectos. El proceso inicia cuando el insecto ingiere a la bacteria con el cristal y la espora; la toxina al llegar al intestino medio comienza el proceso de solubilización por medio de enzimas proteolíticas alcanzando su forma activa, que al interactuar con las células del epitelio ocasiona la destrucción del tejido y finalmente la muerte del insecto. Las esporas quedan libres al medio ambiente y el ciclo de vida de la bacteria comienza nuevamente (Basada en Bravo *et al.*, 2013).

2.1.3 Parasporinas

En 1999, se estudiaron por primera vez inclusiones proteicas parasporales con actividad citotóxica de 1744 cepas de *Bt*. Las proteínas obtenidas se solubilizaron con proteinasa K hasta llegar a su forma activa y se realizaron ensayos *in vitro* en eritrocitos de oveja y en células T de leucemia humana, observando que 60 cepas ocasionaron citólisis debido a la presencia de proteínas Cyt; las 1684 cepas restantes que no tuvieron actividad hemolítica se ensayaron en células T de leucemia humana (MOLT-4), de las cuales 42 mostraron actividad citotóxica contra esa línea celular. Posteriormente, asociaron este proceso con inclusiones parasporales de *Bt* como responsables de una posible actividad anticancerígena (Mizuki *et al.*, 1999; Mizuki *et al.*, 2000).

El Comité para la Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas hasta el momento ha identificado seis familias de parasporinas (PS1-PS6) que exhiben un espectro específico contra diversas células cancerosas humanas (Tabla 2) (Brasseur *et al.*, 2015); además, cuenta con 29 secuencias completas y parciales publicadas en el Gen Bank, de las cuales 19 cuentan con una nomenclatura oficial (Aldeewan, 2014) (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html). Bajo los mismos principios de nomenclatura para proteínas Cry, la clasificación de las parasporinas está basada según el grado de homología entre las secuencias de aminoácidos, así como se muestra en el filograma de la Figura 4.

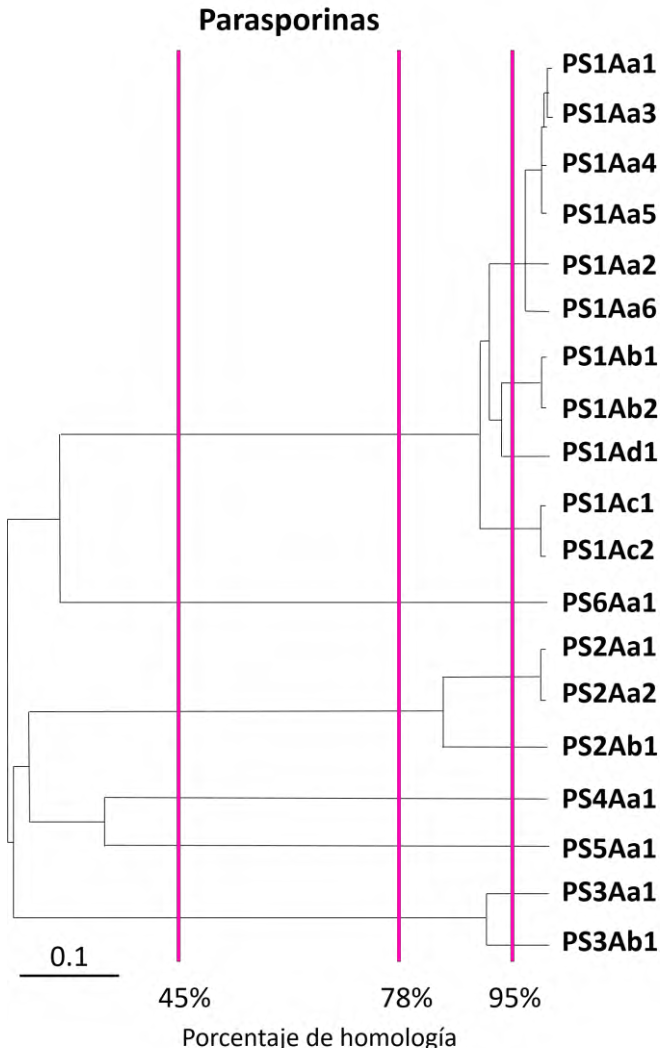


Figura 4. Filograma de parasporinas. Representación del porcentaje de homología entre las parasporinas pertenecientes a las seis familias, PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 Y PS6. (Tomada y modificada del Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp>))

Basadas en su estructura tridimensional, las parasporinas pueden clasificarse en dos tipos: el primero de tres dominios (hojas plegadas β , similares a un cilindro o barril) corresponden a las toxinas Cry de tres dominios con secuencias de cinco bloques altamente conservadas; se expresan en formas nacientes de aproximadamente 80 kDa y se procesan a formas activas con una masa molecular de 60-70 kDa (Figura 5) (Tailor, 1992). Este tipo incluye PS1, PS3 y PS6. El segundo tipo son las β -toxinas formadoras de poros (β -TFP). Sus inactivos precursores son 31-37 kDa y se procesan a formas activas de 27-30 kDa. Las PS2, PS4 y PS5 son pertenecientes a este tipo Akiba y Okumura, 2016).

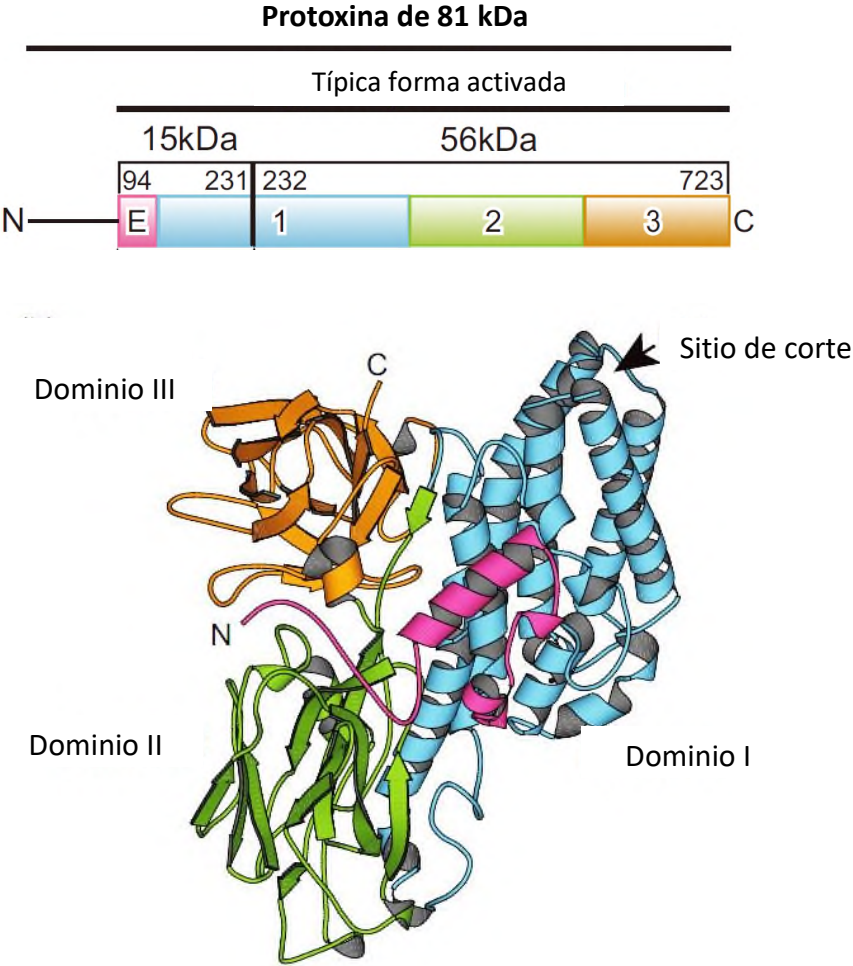


Figura 5. Estructura secundaria de la parasporina PS1Aa1 en su forma activa. Proteína de tres dominios, que en su forma inactiva o protoxina, tiene un tamaño inicial de 81 kDa. Al solubilizarse, cambia su conformación a su forma activa como toxina con un tamaño de 71 kDa (Tomada de Akiba y Okumura, 2006).

2.1.4 Mecanismo de acción de las parasporinas

De la misma manera en que las proteínas Cry se unen a receptores específicos de la membrana plasmática de las células de insectos, las parasporinas poseen una alta especificidad hacia las células cancerosas (Pigott y Ellar, 2007). De acuerdo con modelos para las proteínas Cry, las parasporinas de tres dominios y β -TFP forman poros transmembranales envueltos en estructuras tipo α -hélices y hojas β , respectivamente (Akiba y Okumura, 2016) aunque muchos autores han concluido que son varios los mecanismos de acción citotóxica de las parasporinas, los cuales podrían ser particulares para cada tipo de PS (Tabla 25). En la Figura 6 se muestra el efecto de la actividad citotóxica de una parasporina no identificada en células HL60 de leucemia humana, cuyo mecanismo de acción de esta proteína no se encuentra aún determinado (Ito *et al.* 2004).

Tabla 2. Características de las parasporinas más representativas (Basada en Ohba *et al.*, 2009)

Parasporina	Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Líneas celulares susceptibles ^a	Peso molecular en kDa de su formas(s) nativa/activa(s)	Tipo	Referencia
PS1Aa1	A1190	HeLa, HL-60, MOLT-4, HepG2	81/15, 56	3 dominios	Katayama <i>et al.</i> (2005)
PS2Aa1	A1547	MOLT-4, Jurkat, HL-60, HepG2, CACO-2, Sawano	37/30	β -TFP	Ito <i>et al.</i> (2004)
PS3Aa1	A1462	HL-60, HepG2	88/64	3 dominios	Yamashita <i>et al.</i> (2005)
PS4Aa1	A1470	MOLT-4, HL-60, HepG2, CACO-2, Sawano, TCS	31/27	β -TFP	Okumura <i>et al.</i> (2005)
PS5Aa1	A1100	HeLa, MOLT-4, HepG2, CACO-2, Sawano, TCS, Jurkat, HL-60	33/30	β -TFP	Ekino <i>et al.</i> (2014)
PS6Aa1	M019	HeLa, HepG2	84/14, 59	3 dominios	Nagamatsu <i>et al.</i> (2010)
Proteína no tóxica de 26 kDa ^b	A1470	-	32/26	β -TFP	Akiba <i>et al.</i> (2006)

^aHeLa, células de cáncer cervical; HL-60, células de leucemia promielocítica ; MOLT-4, leucemia linfoblástica aguda humana; Jurkat, leucemia linfoblástica aguda humana; HepG2, células de cáncer hepático; Jurkat, células de cáncer de útero; Sawano, células de cáncer de útero; CACO-2, células de cáncer de colon; TCS, células de cáncer cervical.

^bProteína no tóxica co-purificada con PS4Aa1 de inclusiones parasporales.

Estudios que han evidenciado algunos de los mecanismos de acción de las parasporinas son los bioensayos realizados con células HeLa de cáncer cervicouterino humano, donde la PS1Aa1 provocó un decremento en los niveles de proteínas y en la síntesis de DNA. Esto conllevó a un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el interior de las células aproximadamente a los 3 min después de haber realizado el tratamiento. De esta manera se demostró que esta parasporina induce actividad citotóxica por apoptosis (Ohba *et al.*, 2009). Por otro lado, la PS2Aa1 provocó un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática en células HepG2 de hepatocarcinoma humano. Este proceso fue debido a la unión específica de la toxina a una proteína receptora putativa, aún no identificada, ubicada en la balsa lipídica de la membrana plasmática de las células susceptibles a esta PS. Por técnicas de inmunofluorescencia se pudieron observar los cambios estructurales del citoesqueleto de las células que fueron afectadas por la acción de la PS (Figura 7). El mecanismo involucra la generación de poros membranales formados por oligomerización, que ocasionan lisis celular (Petit *et al.*, 2003; Kitada *et al.*, 2006).

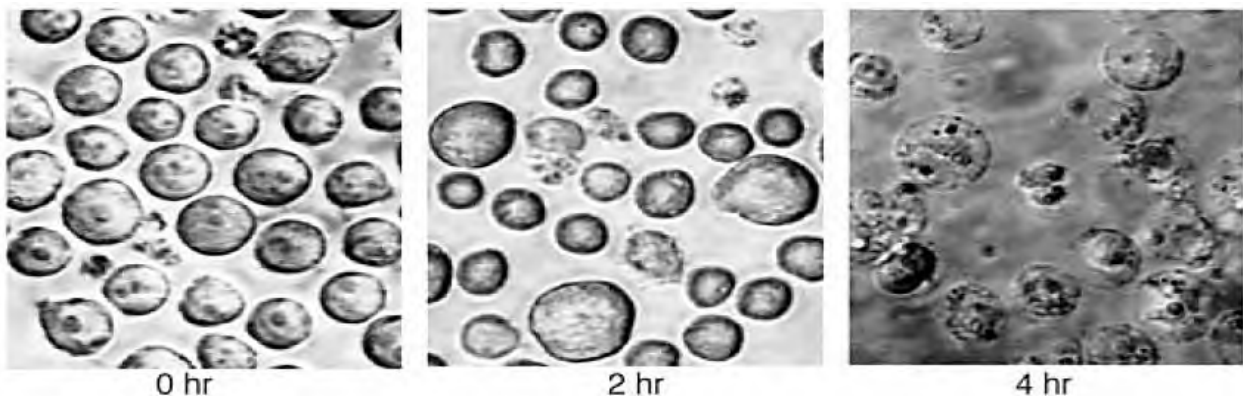


Figura 6. Efecto citotóxico de una proteína parasporal (forma activa en 30 kDa y proveniente de la cepa *Bt* A1547) en células HL60. Las células se incubaron con la proteína parasporal a 37°C a diferentes tiempos y se visualizaron los efectos usando microscopía de contraste de fases. El mecanismo de acción de la citotoxicidad todavía aún no se encuentra determinado (Tomada de Ito *et al.* 2004).

De manera general, se asume que cada parasporina estudiada hasta ahora está dotada de su propio mecanismo para inducir la muerte celular. La PS1 activa la señalización apoptótica debido al aumento de los niveles de iones de calcio (Ohba *et al.*, 2009). La PS2 actúa como una citolisina que causa la permeabilización de la membrana plasmática con unión específica a la célula diana. PS4 es una toxina formadora de poros (Petit *et al.*, 2003). Aunque el modo de acción de PS3, PS5 y PS6 aún necesita ser investigado. La línea celular de carcinoma de hígado humano HepG2 es susceptible a todas ellas (Nagamatsu *et al.* 2010).

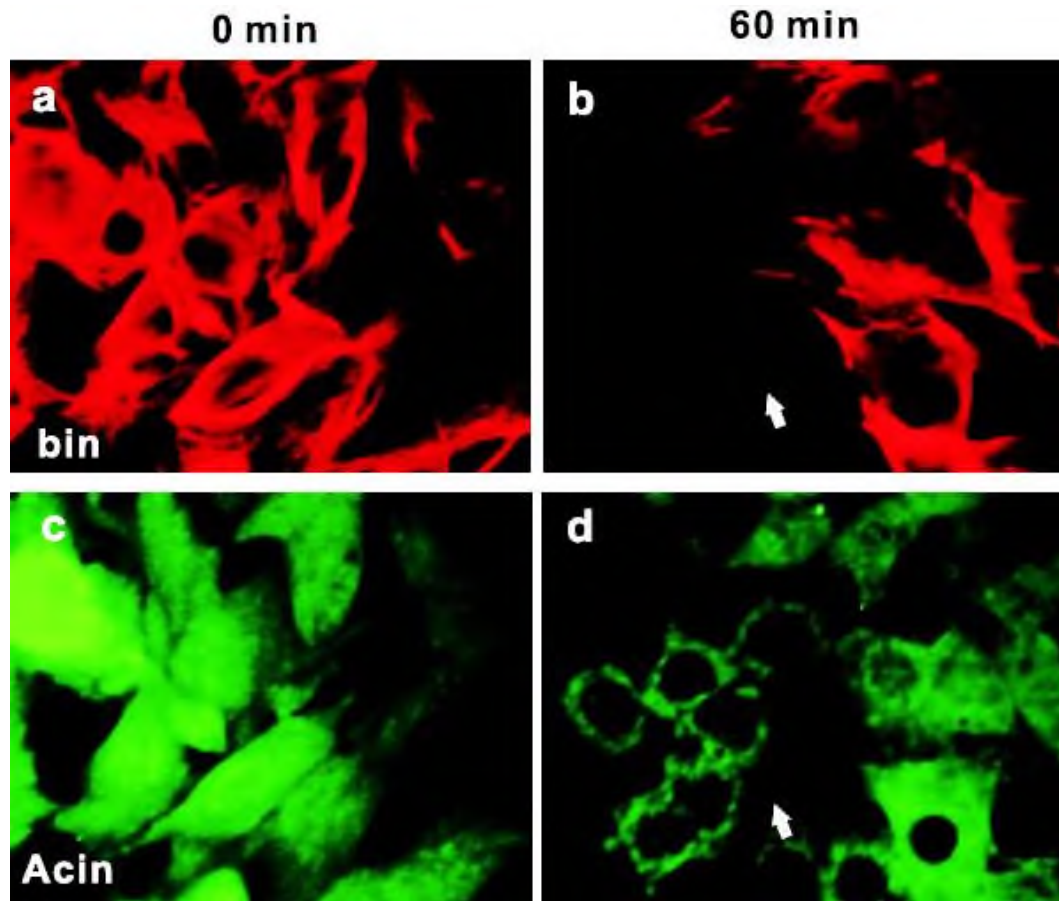


Figura 7. Inmunofluorescencia de la α -tubulina y los filamentos de actina en células HepG2 tratadas con parasporina-2 que permite evaluar los cambios estructurales del citoesqueleto. (Tomada de Kitada *et al.*, 2006).

2.2 *Bacillus thuringiensis* y su importancia en la biotecnología

A partir del siglo pasado, *Bt* ha tenido una importante participación en la biotecnología principalmente en las áreas de la agricultura para el control del plagas (Whalon y Wingerd, 2003), y actualmente en la medicina como un posible agente anticancerígeno (Mizuki *et al.*, 2000).

2.2.1 Bioinsecticidas y control de plagas

En 1901, el científico japonés Shigetane Ishiwata, obtuvo unos aislados del gusano de seda (*Anagasta kuehniella*) los cuales le causaban una enfermedad desconocida (Ishiwata, 1901); una década después, Ernst Berliner redescubrió el agente causal del mismo gusano y lo nombró *Bt* debido al lugar de origen en Turingia, Alemania (Berlinery, 1915). A partir de ese momento, *Bt* comenzó a tener importancia como agente entomopatógeno para el control de plagas en los cultivos agrícolas y como alternativa al empleo de los pesticidas químicos. El primer producto comercial a base de *Bt* se originó en Francia en 1938 con el nombre *Sporeine*[®]. Debido a su eficacia, seguridad en el medio ambiente e inocuidad al hombre, plantas y animales, en el año 2000 las ventas de los bioinsecticidas de *Bt* ascendieron a los 200 millones de dólares y sólo representaba el 2% del mercado mundial de los insecticidas (Roh, 2007).

Debido al desarrollo de la ingeniería genética a partir de la década de los 70, la compañía Plant Genetic Systems de Bélgica desarrolló en 1985 la primera planta transgénica de tabaco portadora de genes Cry. En 1994, en los Estados Unidos se llevó a cabo la primera plantación de cultivos transgénicos en cultivo de papa *Bt*, y en 1996 comenzó su producción a gran escala. El primer cultivo con genes Cry comercializado fue el maíz, seguido de otras variedades resistentes a insectos como papa-*Bt*, soya-*Bt* y algodón-*Bt*, entre otros. Actualmente las plantas transgénicas a base de *Bt* son vendidas por el sector privado en más de 32 millones de hectáreas alrededor del mundo, más de la mitad son de Estados Unidos, 30% de Europa y Rusia, y el 18% en compañías Japonesas; el 57% de las patentes pertenecen a compañías como Monsanto, Micogen, Novartis, AgrEvo, o Syngenta (Brookes, 2006; Sauka, 2008). Entre las plantas transgénicas desarrolladas están arándano (gen cry1Aa), algodón y papa (gen cry1Ac), alfalfa y tabaco (gen cry1Ca) para resistencia a lepidópteros. También se ha transformado genéticamente berenjena, papa y tabaco con el gen cry3A para resistencia a coleópteros (Sauka, 2008).

El empleo de plantas genéticamente modificadas posee la ventaja de reducir la necesidad de aplicar insecticidas y de proveer una protección duradera a lo largo de la temporada de cultivo. Además, los únicos insectos expuestos a la toxina son aquellos que se encuentran alimentándose de los cultivos y no otros. Sin embargo, la mayor ventaja de estas plantas *Bt* es que brindan a los agricultores una alternativa al uso de pesticidas químicos, proveyéndoles una gran importancia económica reflejadas en beneficios para la producción de alimentos y en una mejor calidad medioambiental (Khetan, 2001; Hossain, 2004).

Por otro lado, una desventaja significativa en las plantas *Bt* es la posible generación de resistencia en ciertas poblaciones naturales de insectos que se alimentan de ellas. Esto podría contraer consecuencias en la inutilización de determinadas proteínas Cry para su control, ya sea mediante su empleo en plantas transgénicas o con los bioinsecticidas que las contengan (González-Cabrera, 2001)

2.2.2 Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas

El cáncer se define como la división acelerada de células anormales que llegan a extenderse de su zona habitual para invadir otros tejidos del organismo, proceso conocido como metástasis. Esta enfermedad es la segunda causa de muerte en todo el mundo, siendo casi una de cada seis de las defunciones registradas en 2015 (OMS, 2015).

Las causas del cáncer son multifactoriales, es decir, involucran muchos factores tanto genéticos como químicos, físicos y biológicos; además, una alimentación inadecuada así como la falta de actividad física, potencian el desarrollo de esta enfermedad (OMS, 2015).

Muchos de los tratamientos para eliminar el cáncer son inespecíficos, tienen efectos secundarios que generan dolor y sufrimiento físico y emocional al paciente. Entre ellos destacan la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, trasplante de células madre, entre otros (NIH, 2017). Por estas razones, es que se han buscado otras alternativas más eficientes, selectivas y menos dolorosas para combatir y eliminar a las células cancerosas. Una de esas alternativas, tuvo su origen a finales del siglo pasado cuando el científico japonés Eiichi Mizuki, junto con su equipo de trabajo, estudiaron alrededor de 1744 cepas de *Bt*, de las cuales encontraron otra variedad de proteínas cristalinas con actividad anticancerígena a las que denominaron parasporinas. Estas inclusiones no mostraron actividad hemolítica ni actividad insecticida; sin embargo, tuvieron un

alto nivel de citotoxicidad hacia las células T leucémicas y otros tipos de células cancerosas humanas, destacando su capacidad de discriminar entre células T normales y células leucemias (Mizuki *et al.*, 1999; Mizuki *et al.*, 2000). En la Figura 8, se puede observar la especificidad de una PS2 en tejido de cáncer hepático.

Hasta ahora, muchas de las parasporinas descubiertas con la actividad citotóxica son clonadas y probadas en líneas celulares de cáncer humano estudiando sus diferentes mecanismo de acción (Lee *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2004; Okumura *et al.*, 2011). Particularmente, en la Universidad del Papaloapan se han realizado bioensayos con las proteínas parasporales de las cepas A34 de *Bt* serovar *tolworthi* y AX de *Bt spp.*, aisladas de la región sobre las líneas celulares MDA-MB 231 y MCF-7, ambas de cáncer mama, mostrando actividad antiproliferativa sobre cada una de estas (Cruz-Nolasco, 2017).

Parasporina-2

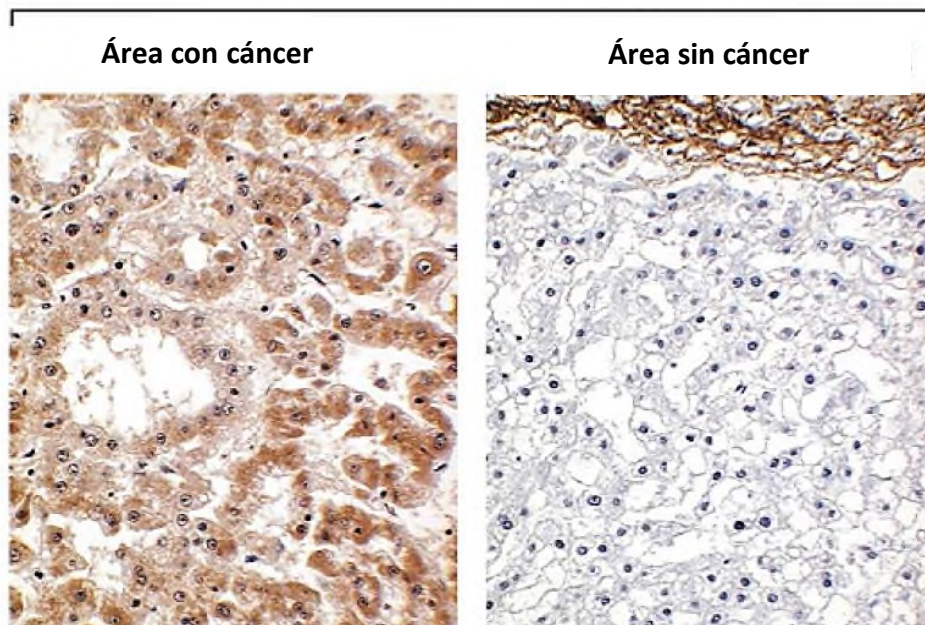


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de parasporina-2 demostrando su especificidad en tejido de cáncer hepático. Se usó un anticuerpo anti-parasporina-2 en tejido con cáncer y sin cáncer y se visualizaron las evidencias de unión específica de la parasporina con las células cancerosas representadas en las áreas de color café (Kitada *et al.*, 2006).

2.3 Identificación de serovares de *Bacillus thuringiensis*

Debido a la importancia que ganaba *Bt* en la agricultura para el control de plagas, surgió la necesidad de clasificar a distintas cepas, al observar que de manera individual tenían actividad insecticida diferente (Sanchis *et al.*, 1988). Esto conllevó al empleo de técnicas de clasificación de cepas para diferenciar entre variedades de serovares, los cuales, basándose en pruebas de serología se definen como un tipo de clasificación de los microorganismos a nivel de subespecie debido a los antígenos que presentan en su superficie celular (Ryan *et al.*, 2004). Sin embargo, por las limitaciones que esta metodología presenta, se han implementado técnicas de clasificación por medio de análisis moleculares, que han permitido identificar serovares de distintas especies de procariotes debido a las diferencias que se presentan entre las secuencias de nucleótidos analizadas, incluso hasta en una sola base, tras las pruebas de alineamiento de secuencias mediante herramientas conocidas como BLAST y CLUSTAL W, contenidas en programas y bases de datos bioinformáticos.

2.3.1 Técnicas de identificación molecular de *Bt* acoplados a análisis bioinformáticos

Hasta hace poco, se habían clasificado 82 serovares de *Bt* provenientes de la colección de cepas del International Entomopathogenic *Bacillus* Center (IEBC), del Instituto Pasteur en Francia (Lecadet *et al.*, 1998). Y por medio de técnicas serológicas del antígeno flagelar H es que ha podido establecerse dicha clasificación en una gran diversidad de cepas de *Bt* (de Barjac y Bonnefoi, 1962). No obstante, la limitante que presenta esta técnica es su capacidad de discernir entre cepas de un mismo serovar que expresen diferentes proteínas Cry, Cyt o parasporinas. Por otra parte, la caracterización bioquímica también se ha empleado como un método para evaluar a *Bt* a nivel de subespecie por medio de análisis de morfología de cristales, perfiles de δ -endotoxinas y bioensayos de actividad insecticida; sin embargo, estas técnicas no logran aún generar una evidencia de su identificación (Lecadet *et al.*, 2001).

Es por ello, que debido a su alta sensibilidad y especificidad, las técnicas moleculares son actualmente consideradas como las principales herramientas de identificación y caracterización de organismos a partir de muestras de material genético. Una de ellas, es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, mejor conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas

en inglés), la cual amplifica segmentos específicos de DNA por medio de ciclos de temperaturas que disocian, hibridan y polimerizan a las dobles cadena (Figura 9). Para estos procedimientos, se requiere de una enzima polimerasa termoestable (Taq polimerasa), oligonucleótidos (cebadores o *primers*), nucleótidos trifosfatados (dNTPs) y cofactores como el Mg^{2+} (Voet *et al.*, 2007).

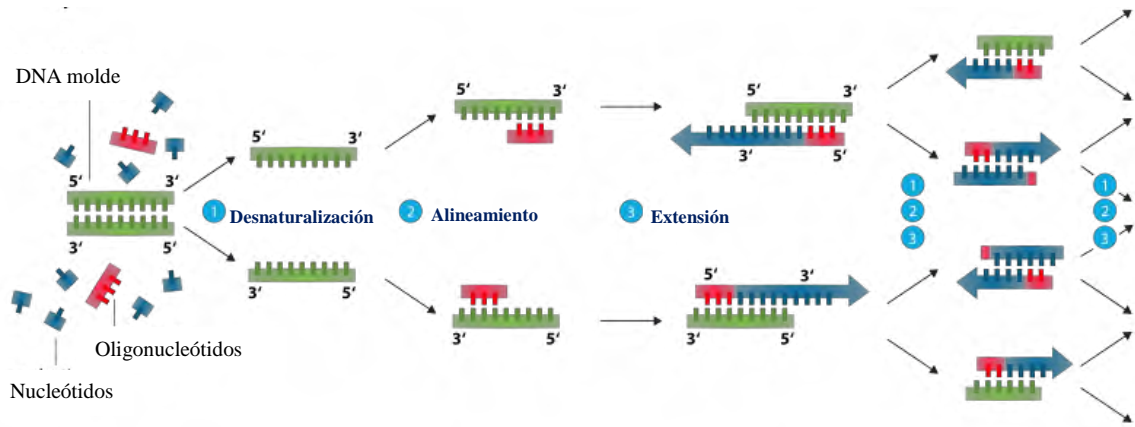


Figura 9. Esquema general de un ciclo completo de PCR. Elementos necesarios para la realización de la reacción y las tres etapas que lo componen: 1) desnaturalización (94-96°C), 2) alineamiento (~68°C) y 3) extensión (72°C). (Imagen tomada y modificada de Upload Wizard, 2014).

La secuenciación es otra técnica de gran importancia y complementaria a la PCR, que permite conocer el ordenamiento concreto de los nucleótidos que componen cualquier ácido nucleico. El método de Sanger se basa en sintetizar, de manera secuencial, una hebra de DNA complementaria a una hebra de cadena simple (cadena molde), en presencia de DNA polimerasa, los cuatro 2'-desoxinucleótidos (dNTPs) y los cuatro dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluoróforos (Figura 10) (Sanger, 2017).

Gracias a estas técnicas de biología molecular, se han logrado identificar y clasificar diversas especies de organismos, con ayuda de la información contenida en las bases de datos de genomas (Wang *et al.*, 2018)

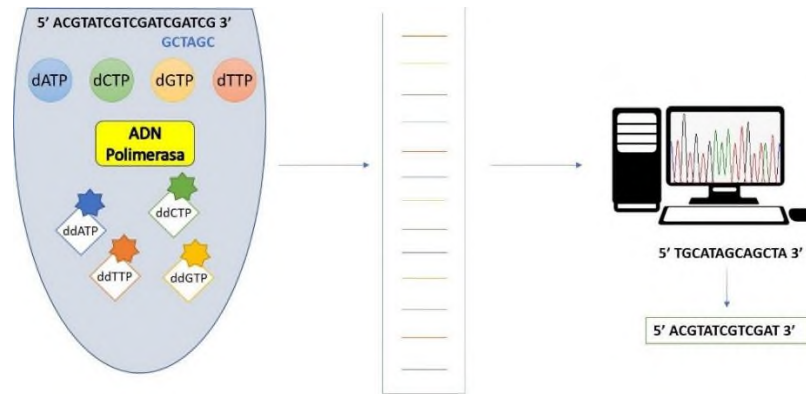


Figura 10. Secuenciación por el método de Sanger. La técnica se basa en la incorporación de ddNTPS marcados con cuatro fluoróforos distintos, una polimerización por PCR y electroforesis capilar en gel de poliacrilamida para la detección de bandas correspondiente a un nucleótido. (Tomada de <https://revistageneticamedica.com/blog/sanger/>, 2017).

La clasificación de especies de bacterias se ha basado en el uso del gen *16S rRNA* por ser considerado como el identificador universal debido a que está presente en todos los organismos procariotes. Este gen codifica para la subunidad pequeña del RNA ribosomal (Woese, 1987; Woese, 1990). En 1997, fue utilizado para diferenciar entre especies de *B. cereus* y *Bt* involucrados en la toxicidad alimentaria. Debido a la estrecha relación filogenética que comparten, los métodos bioquímicos no fueron los suficientes para discriminar entre ambos organismos; por consecuencia, se diseñaron sondas específicas de la región variable (V1) del gen *16S rRNA* de *B. cereus* y *Bt* y se amplificaron con la técnica de PCR (Figura 11). Los resultados indicaron que las sondas de DNA específicas basadas en V1 del *16S rRNA* son adecuadas para identificar y discriminar especies de *Bacillus* que son difíciles de identificar en función de sus propiedades fenotípicas (Giffel *et al.*, 1997).

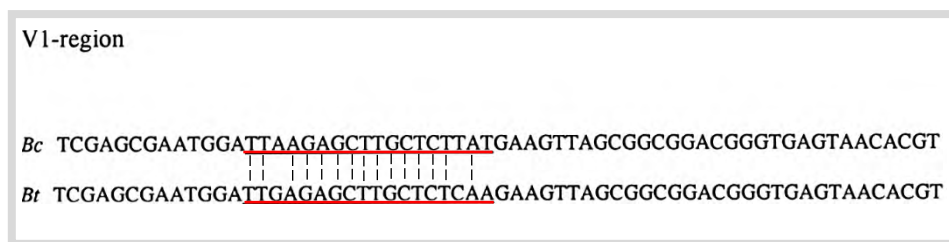


Figura 11. Alineamiento de la secuencia variable de la región V1 de *16S rRNA* de *B. cereus*, *B. mycoides* y *Bt*. Se observa que la sonda de *B. cereus* con respecto a la de *Bt* (marcadas con línea roja), difiere en sólo 3 nucleótidos, mostrando variabilidad para permitir el diseño de sondas de DNA y realizar una diferenciación entre especies (Tomada y modificada de Giffel *et al.*, 1997).

Más tarde, se realizó la misma discriminación de *B. cereus* y *Bt* empleando *16S rRNA* y el gen constitutivo *gyrB* (codificante para la subunidad β de la DNA girasa-topoisomerasa tipo I) (Yamamoto y Harayama, 1995). A través de técnicas de PCR, se probó un gran número de cepas de *Bacillus* y los resultados mostraron complicaciones para la discriminación entre ambos. Por lo tanto, para distinguir entre uno y otro, es necesario la presencia de una característica única, tal como la proteína cristalina o un gen *Cry* (Chen y Tsen, 2001). Lo que hace sugerencia el empleo de genes aún más conservados que puedan lograr diferenciar entre especies de *Bacillus* sin la necesidad de la presencia de una característica bioquímica.

Otro experimento, permitió realizar una identificación entre subespecies de *Bt* por medio de técnicas moleculares y bioinformáticas. El estudio se basó en la amplificación por PCR de los genes *gyrB* y *aroE* (gen constitutivo y de mantenimiento de la enzima Shikimato deshidrogenasa) (Maiden *et al.*, 1998), logrando tener un poder discriminatorio hasta 9 veces mayor que el gen *16S rRNA*. Como resultado, comparado con las técnicas de serotipado H, lograron identificar 25 serovares de 12 serotipos H provenientes de 42 cepas de *Bt* a través de la construcción de árboles filogenéticos, los cuales permiten representar la relación evolutiva de las especies, poblaciones y genes (Sadava y Purves, 2009). Para ello, tuvieron acceso a la base de datos y herramientas bioinformáticas de NCBI (National Center Biotechnology Information), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 3.1 (Soufiane y Côté, 2008).

En la actualidad existen numerosos métodos de clasificación de especies de procariotes, los cuales se basan en el uso de regiones conservadas y genes constitutivos. Entre ellos se encuentran la técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) de genes de RNA ribosomales (Priest *et al.*, 1994), PCR de fragmentos polimórficos amplificados de genes de flagelina (PCR-AFPF) (Yu *et al.*, 2002), Patrones de Plásmidos (Reyesramírez e Ibarra, 2008), perfiles de frecuencias de características (FFP), utilizado para la comparación de genomas completos de bacterias del género *Bacillus* (Figura 12) (Wang y Ash, 2015), y Multilocus Sequence Typing o Tipificación multilocus de secuencias (MLST) (Maiden *et al.*, 1998). Este último fue utilizado para un sistema de caracterización de cepas de *Bt* provenientes del *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC). El análisis se realizó seleccionando siete

genes constitutivos (*glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA* y *tpi*) reportados en la base de datos del PubMLST para el grupo de *B. cereus* y analizaron la correlación de sus resultados con 233 cepas de *Bt* del BGSC, asignándoles 119 secuencias tipo (ST) distintas, logrando identificar 19 nuevas (Figura 13) (Wang *et al.*, 2018).

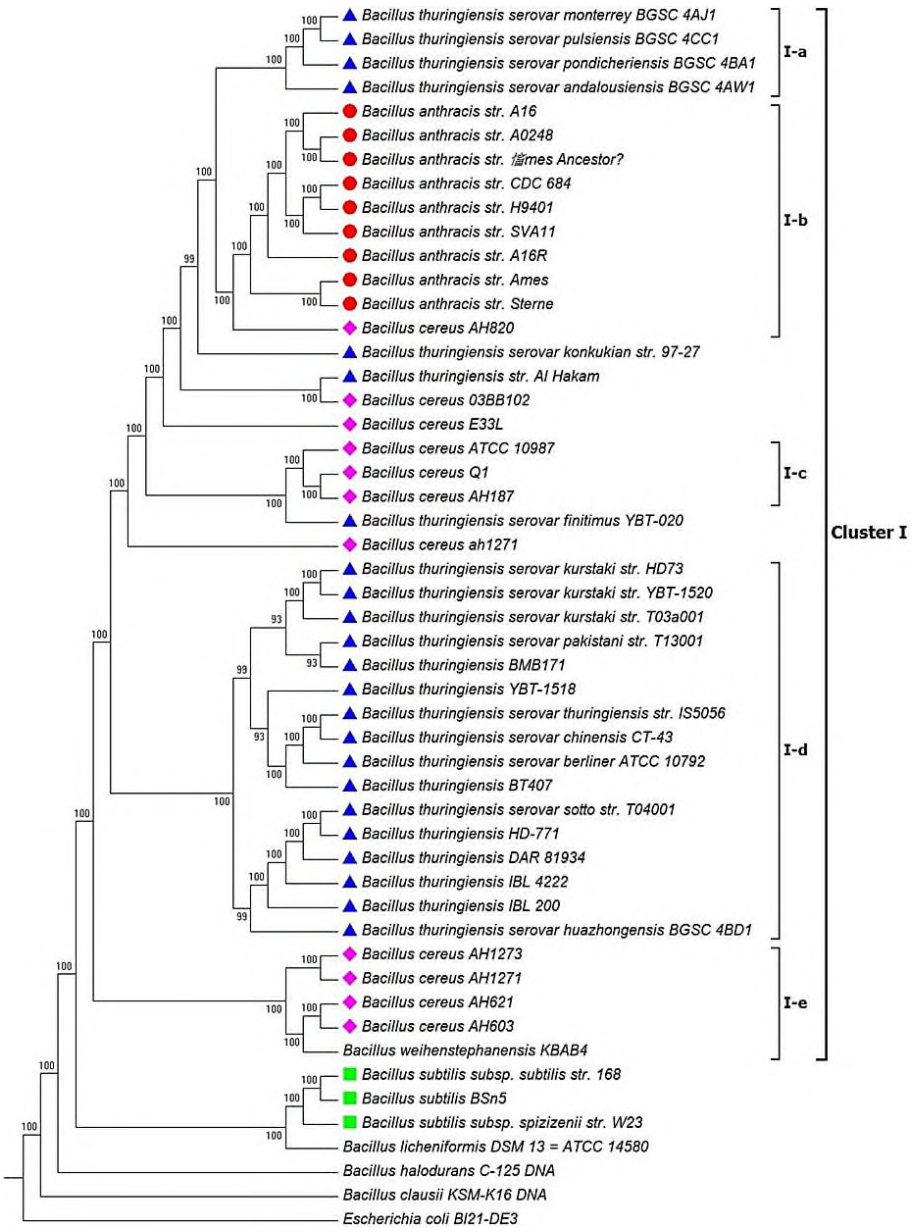


Figura 12. Árbol filogenético de FFP. El árbol se construyó utilizando el algoritmo Neighbor-Joining basado en las características FFP de los Datos del Genoma Completo. Se usó *E. coli* BI21-DE3 (AM946981.2) como *outgroup* en el análisis. Los valores de bootstrap se generaron utilizando 1000 réplicas. Se asignaron diferentes símbolos para representar diferentes especies: triángulo azul para *Bt*; diamante rosa para *B. cereus*; círculo rojo para *B. anthracis*; cuadrado verde para *B. subtilis* (Tomado de Wang y Ash, 2015).

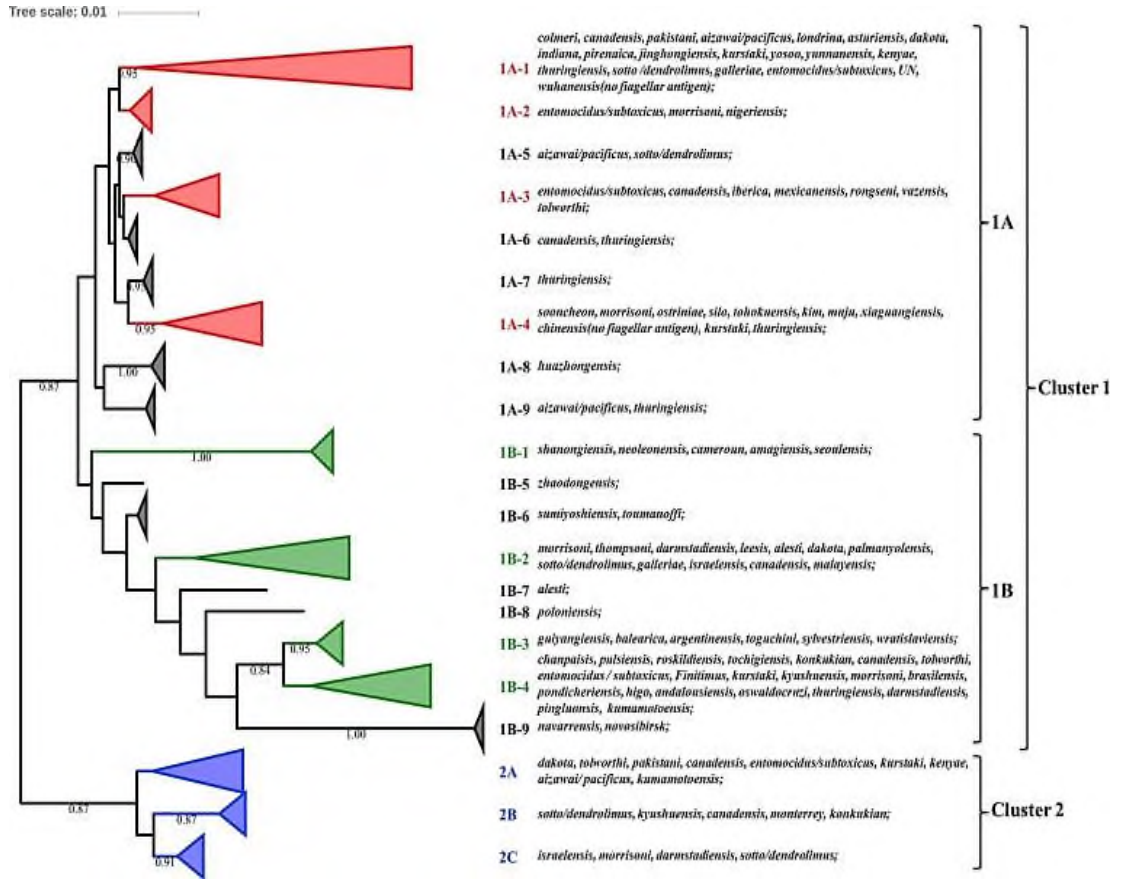


Figura 13. Árbol filogenético de 119 ST asignadas para 233 cepas de *Bt*. El árbol fue construido por el modelo de Neighbor-Joining basado en las secuencias de 7 genes constitutivos (*glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA*, *tpi*) usando el MEGA 5.0 y la herramienta en línea iTOL. El valor del bootstap es de 1000 repeticiones y las áreas de los triángulos representan el número de cepas de *Bt* presentes en cada grupo (Wang *et al.*, 2018).

En la Región del Papaloapan, se aisló y caracterizó molecularmente cepas de *Bt* de suelos cultivados y no cultivados. La identificación molecular se realizó empleando el gen *16S rRNA* para la obtención de una relación filogenética entre variedades de dicha bacteria y compararla con las secuencias de las bases de datos publicadas del NCBI y del RDP (Ribosomal Database Project) mediante alineamientos múltiples en CLUSTAL W y el programa MEGA 6.0. La generación del árbol filogenético permitió dar un acercamiento a los posibles serovares de *Bt* presentes, así como la identificación de otras especies de *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. anthracis* y *B. cereus* (Cruz-Nolasco, 2014).

3 Justificación

Bacillus thuringiensis es una bacteria de gran importancia en la biotecnología al ser aprovechado como un agente para el control biológico de plagas agrícolas y como un productor de proteínas con actividad citotóxica y antiproliferativa contra células de cáncer. Debido a que la clasificación por serovares y caracterización por el gen *16S rRNA* de cepas de *Bt* no permiten una identificación entre cepas productoras de distintas proteínas con actividad insecticida o citotóxica, el presente trabajo propone el uso del gen altamente conservado *gmk* como complemento de identificación a la caracterización molecular por el gen *16S rRNA* y, de esta manera, establecer las bases para identificar las relaciones filogenéticas así como la relación entre la secuencia de estos genes con la producción de diferentes proteínas Cyt, Cry y parasporinas en cepas de *Bt* aisladas de la cuenca del Papaloapan, Oaxaca México.

4 Hipótesis

El gen *gmk*, en conjunto con *16S rRNA*, permitirán identificar molecularmente cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de la región del Papaloapan para establecer una relación filogenética entre serovares.

5 Objetivos

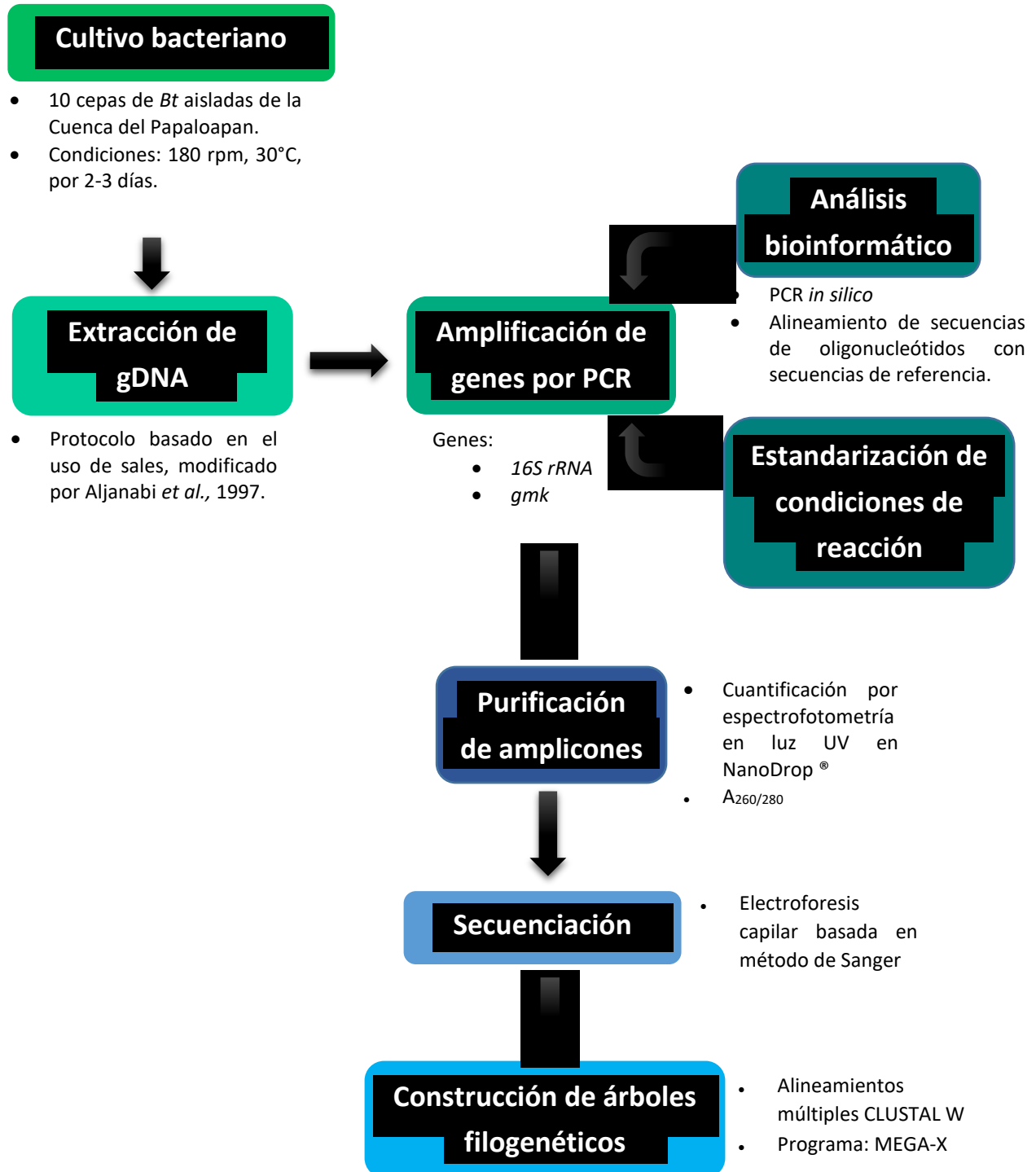
5.1 Objetivo general

Identificar molecularmente cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de la Cuenca del Papaloapan para el establecer una relación filogenética de serovares.

5.2 Objetivos secundarios

- a. Amplificar los genes *16S rRNA* y *gmk* para la identificación de serovares de *Bacillus thuringiensis* de las cepas aisladas de la Cuenca del Papaloapan.
- b. Secuenciar los productos de la amplificación de los genes propuestos y realizar la construcción de árboles filogenéticos para la identificación y clasificación de cepas de *Bacillus thuringiensis*.

6 Materiales y métodos

Figura 14. Esquema general de la metodología para la identificación molecular de *Bt*

6.1 Cultivo bacteriano

Se seleccionaron 10 cepas de *Bt* (AX, AC2, AC3, AC5, A5, A10, A24, A34, IB81 y HD1) almacenadas en el Laboratorio de Bioprocesos, las cuales fueron aisladas por el grupo de investigación de la universidad (Cruz-Nolasco, 2014). Cada cepa se inoculó en 200 mL de caldo nutritivo en matraces de Erlenmeyer de 500 mL, manteniendo en agitación a 180 rpm, a 30°C en un lapso de 2 a 3 días, para asegurar una mayor producción de biomasa bacteriana.

Al término de la fase exponencial del cultivo bacteriano, se tomaron alícuotas de 50 mL en tubos cónicos por cada cepa, se centrifugaron a 5500 rpm por 30 min y se retiró el sobrenadante. Las pastillas obtenidas (biomasa total) se guardaron en refrigeración a 4°C para ser utilizados en la extracción de gDNA.

6.2 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA de las cepas seleccionadas se realizó mediante un protocolo universal basado en el uso de sales por Aljanabi *et al.*, 1997. La cantidad de muestra utilizada para este procedimiento fue la biomasa total de cada cepa de una de las alícuotas que se obtuvo al término de los cultivos. Posteriormente, se añadió a cada tubo un volumen de 400 µL de una solución amortiguadora y de homogeneización compuesta por NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM y EDTA 2mM, a pH 8.0; se mezclaron por medio de pipeteos durante 1 min y las muestras se trasladaron a tubos de 1.5 mL; a continuación, se agregaron 40 µL de SDS 20% y 8 µL de proteinasa K 20 mg/mL para el proceso de lisis celular. Los tubos se mezclaron y se incubaron a 60°C a baño María durante 1 h. Inmediatamente, se agregaron 300 µL de NaCl 6M, se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron a 10 000 *g* por 30 min. Se recuperaron 500 µL de sobrenadante, se mezclaron con 500 µL de isopropanol y se incubaron a -20°C por lo menos 1 h. Posteriormente, se centrifugaron a 10 000 *g* por 20 min. Finalmente, se realizaron lavados con etanol al 70 % y la pastilla obtenida (gDNA total) se resuspendió en 300 µL de agua destilada estéril, se agregaron 10 µL de RNAsa [100 µg/mL] a cada extracción y se conservaron a -20°C.

Para verificar la extracción de material genético, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 3%, a 90 V durante 1 h. Las muestras que presentaron una banda superior a 1.5 kb (basado en el marcador de tamaño molecular) se cuantificaron por espectrofotometría en el equipo NanoDrop®

y al mismo tiempo se realizó el análisis de pureza para evaluar la calidad de DNA obtenido con base a las relaciones $A_{260/280}$.

6.3 Análisis bioinformático y amplificación por PCR

Previamente a la amplificación de los genes por PCR, se realizó una búsqueda bioinformática en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de las secuencias de *16S rRNA* y *gmk* de 2 serovares de *Bt* (también se realizó un análisis parcial para el gen *aroE*, ver Anexos). Las secuencias se descargaron en formato FASTA y manualmente se ubicaron cada una de las secuencias de los oligonucleótidos a utilizar para la amplificación de genes por PCR; de esta manera, se tendría referencia del tamaño de amplicón obtenido con lo referenciado (Talat, 2011; Wang *et al.*, 2018), complementando esta información con pruebas en PCR *in silico* en el sitio web <http://insilico.ehu.es/PCR/>.

Posteriormente, se realizó la amplificación de los genes por PCR con las condiciones descritas en la Tabla 3. Se utilizó el Kit comercial NZYtaq II DNA Polymerase®. Cada mezcla de reacción contenía 10 pmol de cada oligonucleótido y 100 ng de DNA genómico en un volumen total de 50 μ L.

Tabla 3. Condiciones de reacción de PCR para los genes *16S rRNA* y *gmk*

Gen	Oligonucleótidos	Condiciones de reacción
<i>16S rRNA</i> (Talat <i>et al.</i> , 2012)	16S-518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') 16S-800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')	Desnaturalización inicial: 95°C por 5 min. 35 ciclos Desnaturalización: 94°C por 45 s. Alineamiento: 55°C por 60 s. Extensión: 72°C por 60 s Extensión final: 72°C por 7 min.
<i>gmk</i> (Kui Wang <i>et al.</i> , 2018)	gmk-F1 (5'-ATTTAAGTGAGGAAGGGTAGG-3') gmk-R1 (5'-GCAATGTTCAACCAACCACAA-3')	Desnaturalización inicial: 95°C por 5 min. 35 ciclos Desnaturalización: 95°C por 30 s. Alineamiento: 56°C por 30 s. Extensión: 72°C por 60 s Extensión final: 72°C por 7 min

Los productos de amplificación por PCR fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3%, agregando 10 μL de producto a cada pocillo del gel mezclado con 3 μL de buffer de carga y 5 μL de marcador de tamaño molecular NZYDNA Ladder VI[®] de 50-1500 pb. Las condiciones de electroforesis fueron 90 V por 50 min. Posteriormente, los geles se incubaron con el agente intercalante de DNA EpiQuik[®] durante 30 min y se observaron en un transiluminador de luz UV del Laboratorio de Biología Molecular.

6.4 Purificación de productos de PCR

El volumen restante de los productos de amplificación fue utilizado para realizar nuevamente una electroforesis en geles de agarosa al 3%, agregando ~ 40 μL de producto en cada pocillo. Las condiciones de electroforesis fueron 90 V por 40 min. Una vez teñidos los geles durante 30 min en la solución intercalante de DNA, se observaron en el transiluminador y se cortaron los fragmentos de las bandas amplificadas con un bisturí y se almacenó cada uno en un tubo de 1.5 mL para la purificación del DNA con el Kit Epigentek Isolation[®].

Los productos de la purificación se cuantificaron y se enviaron a secuenciar por electroforesis capilar basada en el método de Sanger, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las muestras contuvieron 100 ng de producto de PCR, 1 μL del oligonucleótido [10 μM] y agua grado biología molecular en un volumen total de 16 μL .

6.5 Construcción del árbol filogenético

Los resultados obtenidos de la secuenciación se analizaron en el programa bioinformático MEGA-X. Los electroferogramas de cada una de las cepas se ajustaron de tal manera que sólo quedarán las mejores regiones con menores errores de secuenciación posibles (señales definidas). Las secciones que presentaron mucho ruido o señales inusuales, se eliminaron; quedando así, sólo la región que sería útil para los alineamientos.

Una vez seleccionadas las mejores regiones del electroferograma de cada una de las cepas, se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo CLUSTAL W, con las secuencias en formato FASTA de dichas secciones de cada cepa. El resultado obtenido encaminó a la selección de una secuencia

consenso, es decir, a una región del alineamiento en la que se presentara el mayor número de coincidencias de nucleótidos en todas las cepas.

En la base de datos del NCBI y EZ BioCloud, se seleccionaron secuencias de distintas variedades de *Bt* y otras del género *Bacillus*: *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. subtilis*, para ser empleadas como referencia durante la identificación filogenética. Y el procedimiento para la obtención de la secuencia consenso de estas secuencias de referencia fue el mismo que el descrito anteriormente para las cepas.

Ambas regiones consenso (de las cepas aisladas y de referencia) se alinearon nuevamente con CLUSTAL W y fueron utilizadas para la construcción del árbol filogenético en el programa MEGA-X con el método de Neighbor-Joining y Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood), con un bootstrap de 1000 réplicas.

7 Resultados y discusión

7.1 Extracción de DNA genómico

Para verificar la presencia de gDNA y su integridad obtenidos durante las extracciones para cada una de las cepas, se realizaron electroforesis en geles de agarosa 3%. En la Figura 15 se muestran bandas de gran tamaño molecular, indicando la presencia de gDNA. Particularmente AX mostró una baja concentración, coincidente con los datos obtenidos en la cuantificación por espectrofotometría $A_{260/280}$ en NanoDrop® (Tabla 4).

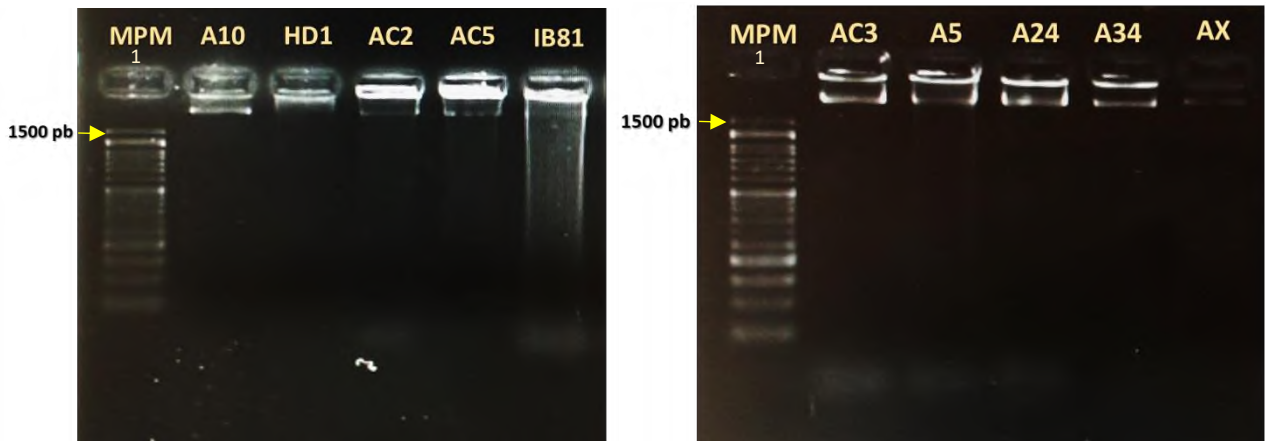


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 3% de gDNA de cepas de *Bt*. Se observan las bandas correspondientes al gDNA de las cepas seleccionadas de *Bt*, por encima de las 1500 pb. En ambos geles, el carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 50-1500 pb (MPM) y en el resto de los carriles se mencionan cada una de las cepas.

Tabla 4. Cuantificación de gDNA de las cepas seleccionadas de *Bt*

Cuantificación de gDNA		
Cepa	ng/ μ L	A _{260/280}
A34	160.6	1.98
AC3	203.5	2.02
AX	143.7	1.67
A5	3552.7	2.12
AC2	1440	1.84
A24	2599.5	1.95
A10	4615.3	2.10
HD1	6604	2.0
AC5	2286.8	2.12
IB81	4080.1	2.14

En algunas cepas se obtuvieron elevadas concentraciones de material genético, por ello se realizaron diluciones, de tal modo que todas las muestras contuvieran 100 ng/ μ L de DNA.

7.2 Análisis bioinformático

Antes de iniciar con el proceso de amplificación por PCR, se realizó un análisis bioinformático de cada uno de los genes y de sus pares de oligonucleótidos correspondientes para obtener una mayor información respecto a la posición de alineamiento de los oligonucleótidos sobre los genes de interés y el tamaño de amplicón esperado.

Primeramente, para el gen *16S rRNA*, se seleccionó la secuencia en formato FASTA (NC_022873.1) perteneciente al serovar *Bt* YBT-1518. En Microsoft Word versión 2013®, la secuencia del gen fue insertada y con la opción de búsqueda de caracteres se ubicaron las secuencias de los oligonucleótidos 16S-518F y 16S-800R. De esta manera se obtuvo la ubicación exacta de ambos oligonucleótidos en el gen y la longitud del amplicón esperado (Figura 16).



Figura 16. Alineamiento de los oligonucleótidos de 16SrRNA en secuencias de referencia. Se ubican los oligonucleótidos 16S-518F (amarillo) y 16S-800R (complementariedad inversa, verde) en la secuencia de referencia del gen 16S rRNA del serovar YBT-1518 de *B. thuringiensis*, donde muestra una región teórica amplificada 285 pb.

Dicho resultado no coincidió con lo reportado por Talat *et al.*, 2011 a pesar de utilizar el mismo diseño de oligonucleótidos. Los autores obtuvieron un amplificado de 1500 pb; en contraste, los resultados obtenidos en los análisis bioinformáticos y en PCR *in silico* demostraron de manera teórica un amplicón de 285 pb (Figura 17), similares a los que se encontraron en este trabajo. Lo que nos permite decir que el resultado fue el esperado.

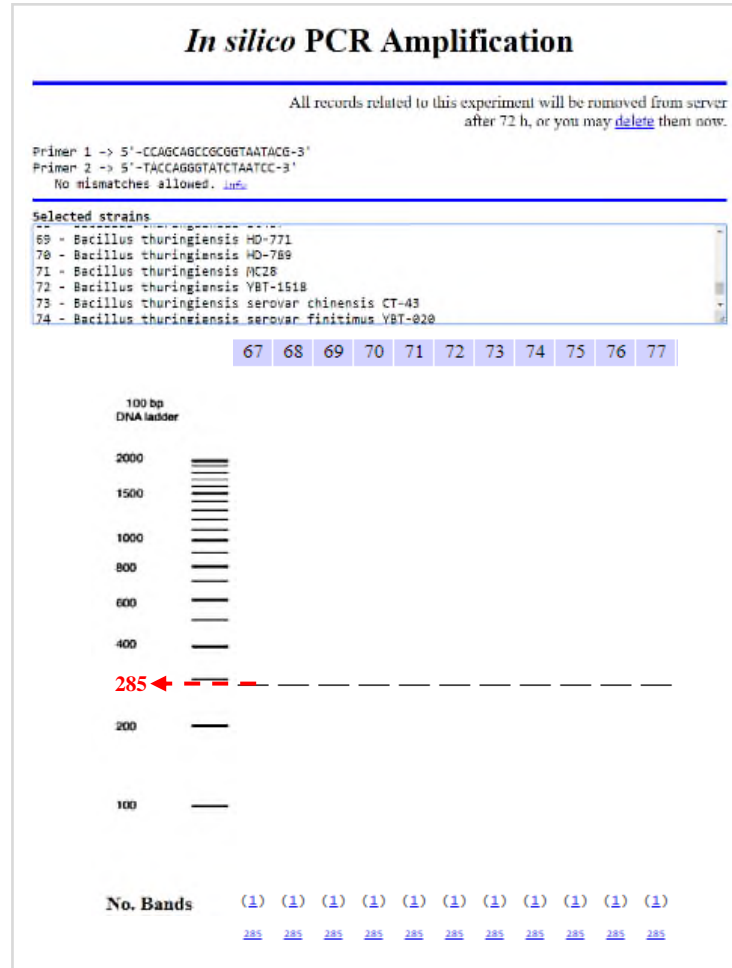


Figura 17. PCR *in silico* del gen 16S rRNA. Se muestran bandas amplificadas de 285 pb para 10 serovares distintos de *Bt*, empleando los oligonucleótidos 16S-518F y 16S-800R. Entre los amplificados, destaca el carril 72 que muestra la variedad YBT-1518 (mencionada en la Figura 14), que coincide con el tamaño de amplicón teórico.

Por otro lado, la secuencia del gen *gmk* se obtuvo del serovar *konkukian* cepa 9-27 de *Bt* (NC_005957.1) y se alinearon los oligonucleótidos *gmk*-F1 y *gmk*-R1 sobre la misma para tener una referencia de su ubicación sobre el gen y del tamaño de amplicón esperado. El oligonucleótido *gmk*-F1 tuvo un alineamiento parcial al situarse sólo parte de su secuencia sobre el gen, pero suficiente para que la enzima Taq polimerasa pudiese llevar a cabo la síntesis del resto de nucleótidos (Figura 18). En los análisis de PCR *in silico* no se pudieron observar resultados en la amplificación debido a que posiblemente su base de datos es limitada.

```
>NC_005957.1:c3710330-3709686 [Bacillus thuringiensis] serovar konkukian
str. 97-27 chromosome, complete genome
GTCAGGAAGGGTAGGTTTTACATATTTATGAGAAGTAGAAGAGGATTGCTCATCGTTCTTTCAGGACCTT
CTGGTGTGGGAAAGGAACGGTTCGAAAAGAGCTGTTTAGTCATGAGGATACACGTTTTTCAGTACTCCAT
TTCAGTAACGACACGTAAGCCACGTGAAGGTGAAGTGGATGGTGTGGATTATTTCTTTAAAGAGAGAGAA
GAATTTGAGGAAATGATTCGTAATGAAAAATTACTTGAGTGGGCTGAGTTCGTAGGTAATTATTACGGAA
CACCAATTGACTATGTTGAAAAACATTGCAAGAAGGAAAAGATGTATTCTTAGAAATTGAAGTGCAAGG
AGCAATTCAGTTAAGAAAGCTTTCCAGAAGGTGTATTTATTTCTTAGCACCTCCAAGTTTATCTGAA
CTAAAGAACCGAATTGTCGGTCGTGGTACAGAACTGAAGATGTTATTGAAAATCGTTAACGGTAGCGA
AAGAAGAAATTGATATGATGGACGCTTACGACTACGTTGTAGAAAACGACCAAGTTGAAGTACTGCTTGTGA
AAGAATTAAGCAAATTGTGGTTGGTGAACATTGC CGCCGCGAAAGAGTAGCAAAATATTATAAAGAAATG
ACGGAGGGTCTATAA
```

Tamaño de amplicón: 590 pb

```
AGGAAGGGTAGGTTTTACATATTTATGAGAAGTAGAAGAGGATTGCTCATCGTTCTTTCAGGACCTT
CTGGTGTGGGAAAGGAACGGTTCGAAAAGAGCTGTTTAGTCATGAGGATACACGTTTTTCAGTACTC
CATTTCAGTAACGACACGTAAGCCACGTGAAGGTGAAGTGGATGGTGTGGATTATTTCTTTAAAGAG
AGAGAAGAATTTGAGGAAATGATTCGTAATGAAAAATTACTTGAGTGGGCTGAGTTCGTAGGTAATT
ATTACGGAACACCAATTGACTATGTTGAAAAACATTGCAAGAAGGAAAAGATGTATTCTTAGAAAT
TGAAGTGCAAGGAGCAATTCAGTTAAGAAAGCTTTCCAGAAGGTGTATTTATTTCTTAGCACCT
CCAAGTTTATCTGAACTAAAGAACCGAATTGTCGGTCGTGGTACAGAACTGAAGATGTTATTGAAA
ATCGTTTAAACGGTAGCGAAAGAAGAAATTGATATGATGGACGCTTACGACTACGTTGTAGAAAACGA
CCAAGTTGAAGTACTGCTTGTGAAAGAAATTAAAGCAAATTGTGGTTGGTGAACATTGC
```

Figura 18. Alineamiento de los oligonucleótidos de *gmk* en *Bt* serovar *konkukian* cepa 97-27. Los oligonucleótidos *gmk*-F1 (en amarillo) y *gmk*-R1 (complementaria inversa, en verde) generan un amplificado teórico de aproximadamente 590 pb.

Finalizados los análisis bioinformáticos y asegurando que efectivamente los oligonucleótidos proporcionaron la información requerida para la realización de las reacciones de PCR, se prosiguió con el amplificado de cada uno de los genes en las diferentes cepas de *Bt*.

7.3 Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se realizaron con base a las condiciones descritas en la Tabla 3, para cada una de las 10 cepas seleccionadas de *Bt*. Finalizando dichas reacciones, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 3% para observar las bandas amplificadas de cada uno de los genes analizados.

7.3.1 Gen *16S rRNA*

El gen *16S rRNA* mostró una banda esperada de 285 pb en todas las cepas utilizadas (Figura 19), similar al tamaño de amplicón de los análisis bioinformáticos y pruebas *in silico*. El análisis electroforético indicó que la reacción de PCR fue específica, ya que solamente se obtuvo una única banda en cada carril. A pesar de utilizar una concentración igual de templado de gDNA para todas las cepas, se destaca que en AX, AC3 y A5 las bandas amplificadas muestran una mayor intensidad, es decir, una mayor concentración de producto que el resto de las cepas.

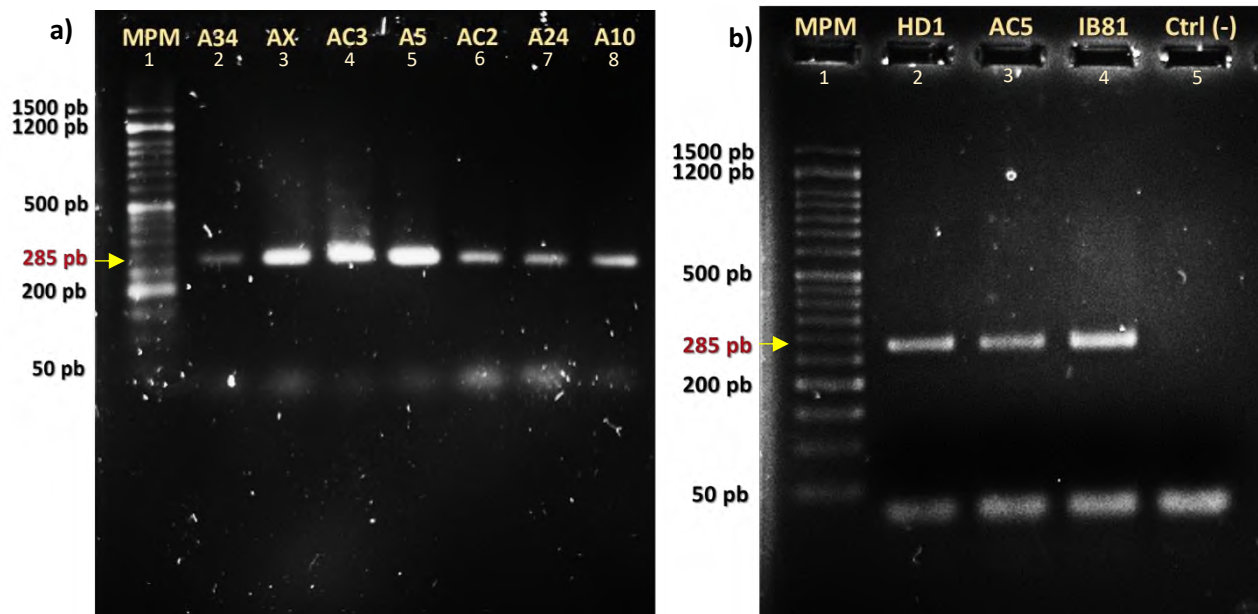


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de la amplificación por PCR del gen *16S rRNA*. Los gels de agarosa muestran bandas amplificadas de 285 pb en las cepas A34, AX, AC3, A5, AC2, A24 y A10 en el gel a) y en HD1, AC5 e IB81 en el gel b). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 50 min, para cada gel. En los carriles 1 de a) y b) MPM indica marcador de tamaño molecular y Ctrl (-) el control negativo en el carril 5 de b).

7.3.2 Gen *gmk*

La amplificación del gen *gmk* se realizó con las condiciones de temperatura descritas por Wang *et al.*, 2018. Se emplearon 10 μ L de producto de PCR para la electroforesis en gel de agarosa 3% para observar los fragmentos amplificados.

En la Figura 20 a) se ilustran bandas únicas de PCR obtenidas de tamaño cercano a las 600 pb para las cepas A34, AX, AC3, A5, AC2, A24 y A10, coincidiendo con el tamaño de amplicón encontrado

en los análisis bioinformáticos. Además, de manera semi-cuantitativa se obtuvo una concentración superior a los 70 ng/5 μ L, tomando como referencia la banda de 500 pb (67 ng) en el marcador de tamaño molecular utilizado (Figura 20, b). Esto permitió determinar que hubo una eficiencia de la reacción bajo las condiciones de temperatura empleadas en la PCR, lo que conllevaría posteriormente a la obtención de altos rendimiento y calidad del DNA en el paso de purificación.

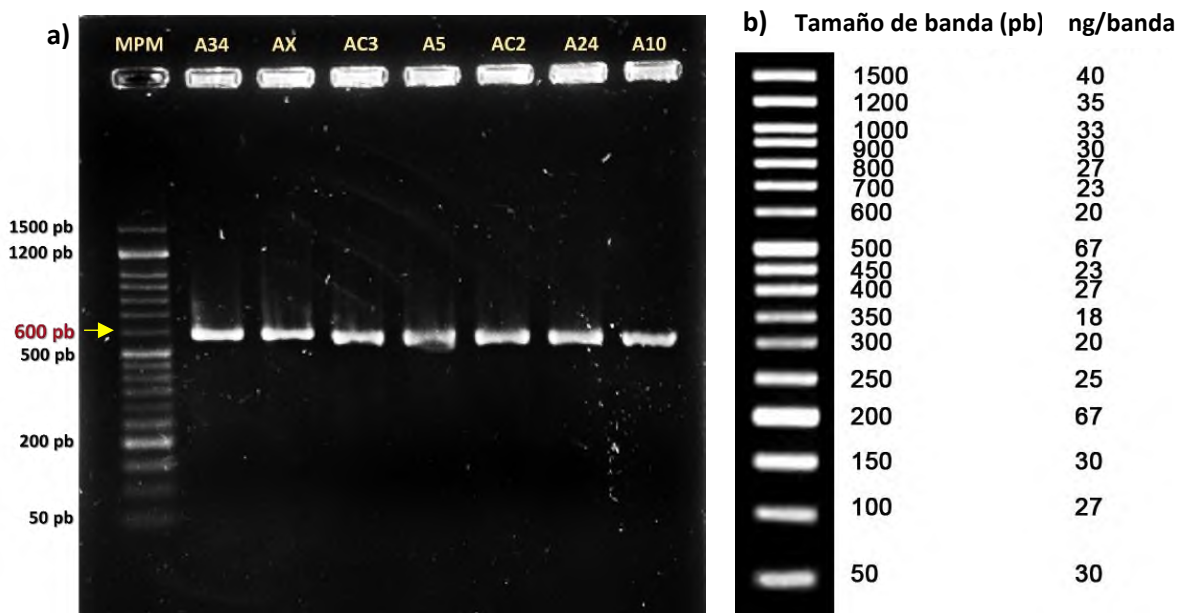


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de la amplificación por PCR del gen *gmk* en relación con el marcador de tamaño molecular. En la imagen a) se muestran las bandas amplificadas del gen *gmk* de aproximadamente 600 pb de las cepas A34, AX, AC3, A5, AC2, A24 y A10. En el carril uno se sitúa el marcador de tamaño molecular (MPM). La imagen b) corresponde al marcador de tamaño molecular NZYDNA Ladder VI[®] utilizado para las electroforesis, donde se indican las relaciones de concentración en función del tamaño de banda por cada 5 μ L agregados (Tomada y modificada de <https://www.nzytech.com/>).

7.4 Purificación y secuenciación

Una vez que se obtuvieron las mejores reacciones de PCR mostradas en los geles de electroforesis de cada uno de los genes, se realizó una segunda separación electroforética en pocillos más anchos para agregar aproximadamente el volumen restante del producto de PCR (~40 μ L).

Las bandas obtenidas se recortaron directamente de los geles de agarosa 3% (Figura 21) y se guardaron en tubos de 1.5 mL. Posteriormente, se realizó la purificación de DNA de cada uno de los fragmentos con base al protocolo del Kit Epigentek Isolation[®], eluyendo en un volumen final de 30 μ L de agua grado biología molecular.

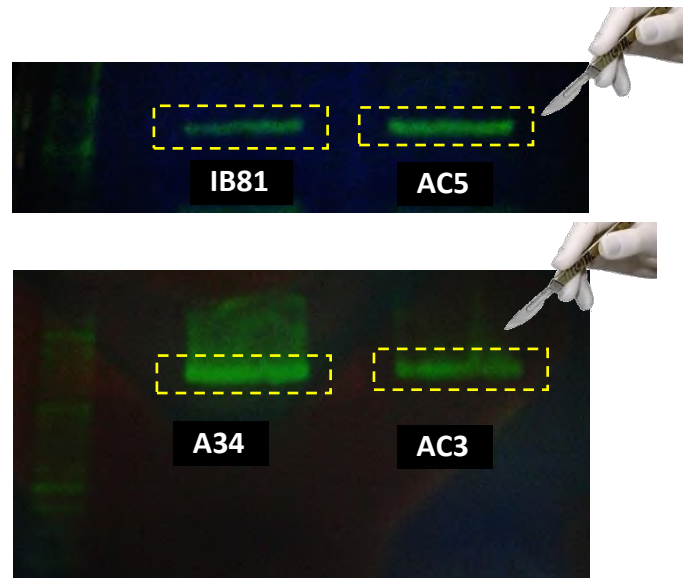


Figura 21. Geles de agarosa 3% con bandas amplificadas de genes previos a la purificación. En la imagen se ejemplifican las bandas que fueron utilizadas para la purificación de DNA de los fragmentos amplificados.

Del gen *16S rRNA*, se purificaron los fragmentos del gel de agarosa de las cepas A34, A24, HD1, IB81, AC2, AC3, AC5, AX y A5; de *gmk*, las cepas A10, AC3, HD1, AX, AC2, AC5, A24, A34, IB81 y A5. Los DNA purificados se cuantificaron por espectrofotometría luz UV en NanoDrop[®], y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

En el caso del amplicón del gen *16S rRNA*, las cepas que lograron cumplir con la concentración requerida fueron AC2, AC5, IB81, AX, A24 y A5; para *gmk* fueron todas las cepas. Los datos de concentración del gen *gmk* mencionados en la Tabla 5, coinciden en gran medida con los resultados observados en los geles de agarosa en la Figura 20, donde las bandas reflejaron una mayor concentración de DNA comparado con los productos de PCR en los geles de electroforesis y en los datos de cuantificación de los purificados del gen *16S rRNA*.

De acuerdo con los lineamientos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, las muestras se prepararon en un volumen total de 16 μL en un microtubo para PCR, conteniendo 100 ng de DNA purificado de cada gen y 1 μL de sus oligonucleótidos correspondientes. Finalmente, se enviaron a secuenciar por electroforesis capilar basada en el método de Sanger.

Tabla 5. Cuantificación de DNA purificado del producto de amplificación de los genes *16S rRNA* y *gmk* en cepas de *Bt*.

Cepa	Concentración (ng/ μL)	
	16S rRNA	<i>gmk</i>
A34	3.9	44.3
A24	10.0	50.5
HD1	1.0	52.6
A5	7.0	49.1
AC2	17.1	53.2
AC3	2.9	45.0
AC5	14.0	44.8
IB81	7.3	43.0
AX	7.2	46.0
A10	2.3	25.2

7.5 Árboles filogenéticos

En los resultados de la secuenciación, se obtuvieron electroferogramas y secuencias en formato FASTA de las cepas AC2, AC5, IB81 y AX del gen *16S rRNA* y de *gmk* se obtuvieron todas las cepas.

Para *16S rRNA*, los electroferogramas que presentaron algunas secuencias fallidas se estimaron como posibles errores a causa de bajas concentraciones de DNA u oligonucleótidos, o la formación de dímeros y/o estructuras secundarias durante el procedimiento de purificación. Debido a esto, se tomaron las regiones de las secuencias que presentaron mejores señales para la consideración de los alineamientos y secuencias consenso.

En la Figura 22 se presenta el electroferograma de la cepa AC2 de *16S rRNA*. Como comúnmente ocurre en las secuenciaciones, las regiones iniciales y finales presentan algunos errores de secuenciación, así que se decidió eliminar dichas secciones y dejar las que se consideraran mejores, es decir, las que tuvieran señales más definidas; además, debido a que el tamaño de la secuencia es mucho menor (<260 pb) al tamaño de las secuencias de referencia de las bases de datos (~1500 pb) y reportadas por otros autores (Chen y Tsen, 2002; Soufiane y Côté, 2009), se optó por tomar la mayor longitud posible para los alineamientos. En la Figura 22 a), se señala en color gris la región descartada para el alineamiento, siendo considerada el resto de la secuencia como la que presenta menores errores. Posteriormente, la secuencia considerada se insertó en formato FASTA en la sección del Explorador de Alineamientos del MEGA-X para realizar un alineamiento múltiple con las cepas restantes, empleando el algoritmo de CLUSTAL W. Este procedimiento se siguió con las cepas restantes AC5, IB81 y AX, a partir de sus electroferogramas hasta la incorporación de su formato FASTA.

Cuando todas las secuencias de las cepas fueron insertadas en FASTA, se prosiguió a realizar el alineamiento múltiple por CLUSTAL W y posteriormente se seleccionó la región de la secuencia consenso, mostrada en la Figura 23.

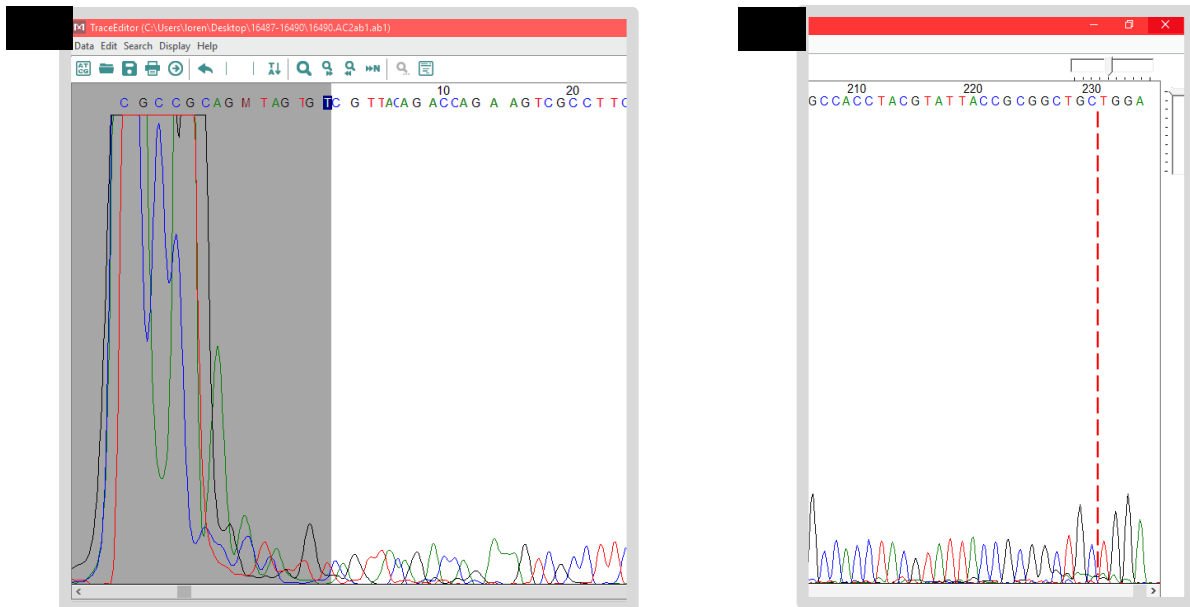
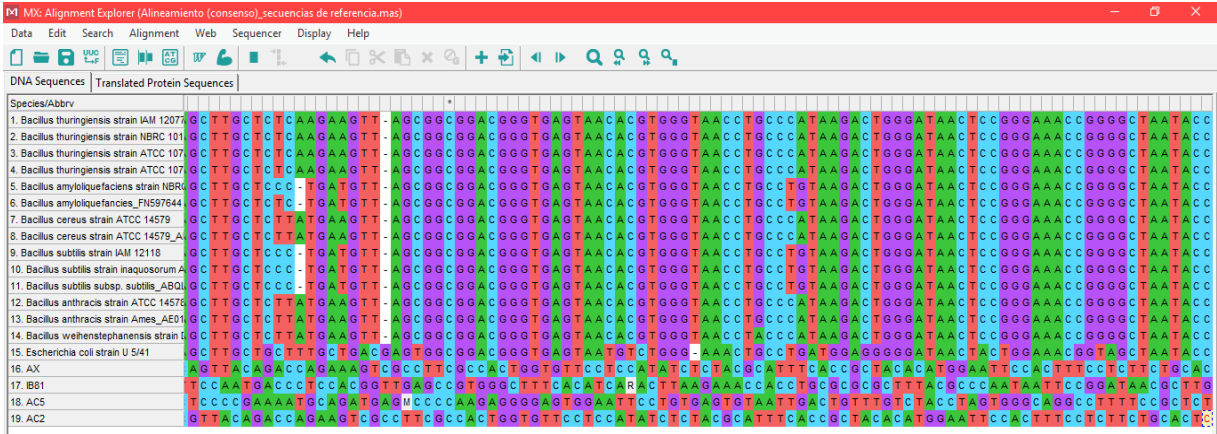


Figura 22. Electroferograma de la cepa AC2 del gen *16S rRNA*. a) Se visualiza en color gris la región descartada para el alineamiento. A partir de esa posición se consideraron las señales mejores definidas de secuenciación hasta la posición 230 marcada con línea punteada, en b).

modelo de Máxima Verosimilitud y aplicando un bootstrap de 1000 réplicas. El árbol filogenético resultante se presenta en la Figura 26 y muestra la relación filogenética entre las secuencias de referencia del gen *16S rRNA* que se mencionan en la Tabla 4, con las cepas AX, AC2, IB81 y AC5. En los árboles filogenéticos de las Figuras 26 y 27 se aprecian dos grupos definidos: las secuencias de referencia del grupo de *B. cereus sensu lato* y el grupo de las cepas de interés. La bacteria *E. coli* es un microorganismo perteneciente a la familia de las enterobacterias; por este motivo, se utilizó como *outgroup* para representar un taxón lejanamente emparentado con las especies empleadas en el análisis y así observar de mejor manera cómo se llevaba a cabo la discriminación.

a)



b)

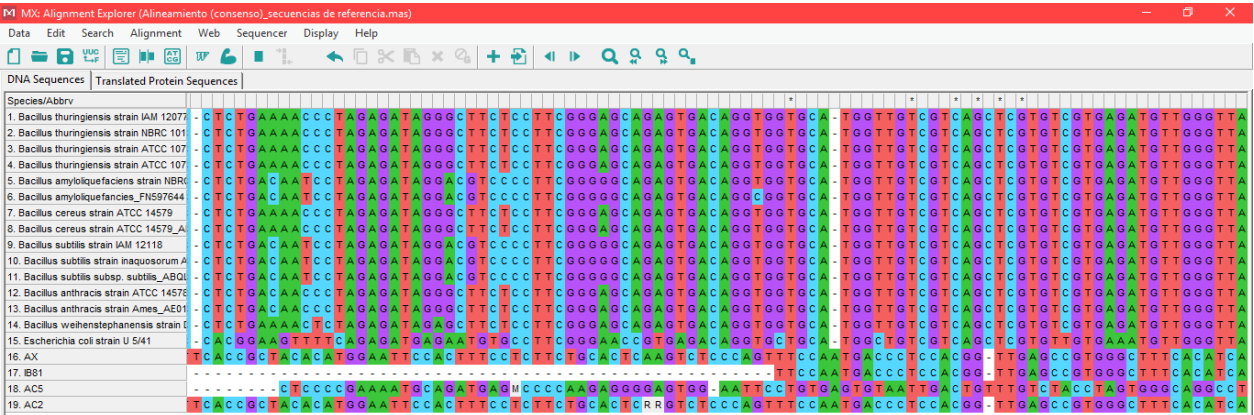


Figura 25. Alineamiento múltiple de secuencias consenso de las cepas aisladas y cepas de referencia de las bases de datos. a) Las secuencias consenso de las cepas aisladas y las de referencia se añadieron a una nueva ventana antes de realizar nuevamente un alineamiento múltiple de ambas; posteriormente se realizó el alineamiento con el algoritmo de CLUSTAL W, donde se pudieron visualizar las regiones de mayor coincidencia de las cepas aisladas con las de referencia, b).

En el árbol original de la Figura 26, las cepas IB81, AC2, AC5 y AX no pertenecen a ninguna especie del grupo de *B. cereus sensu lato*, sino más bien como especies homológamente más parecidas a *E. coli*.

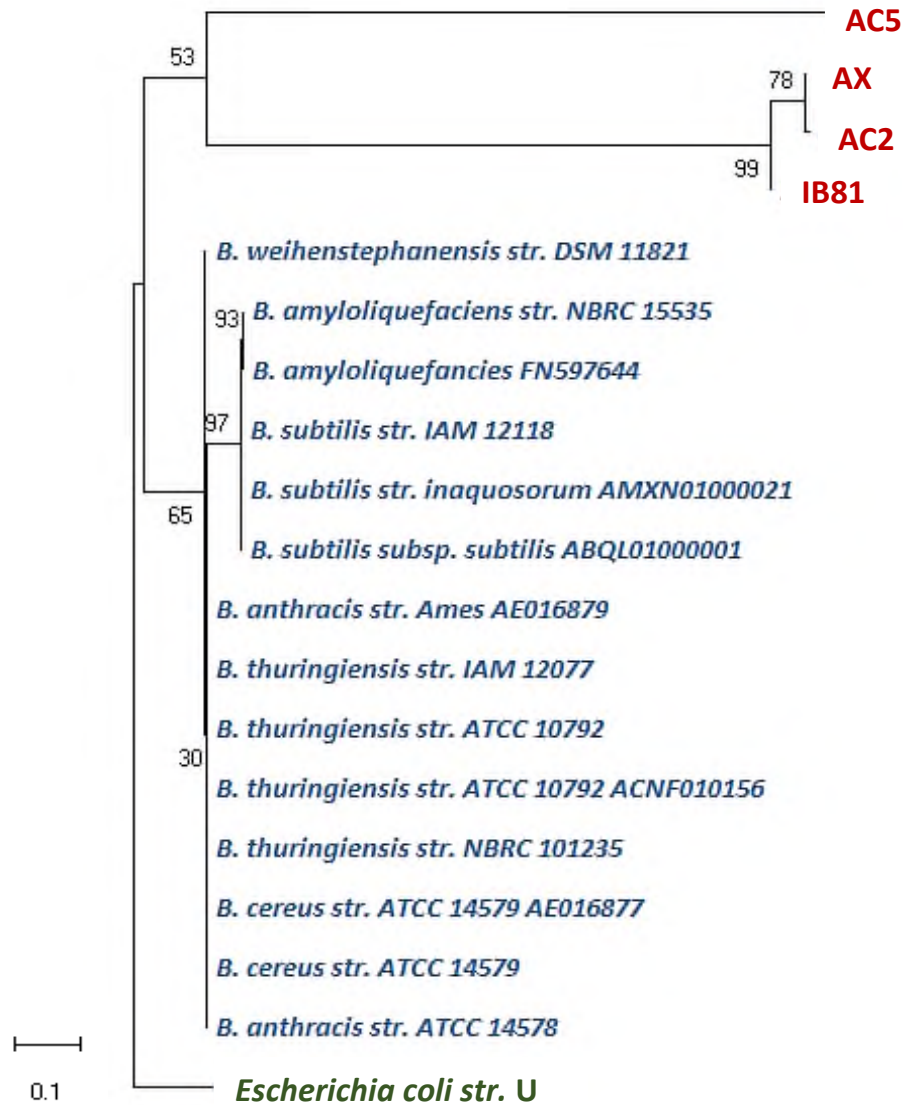


Figura 26. Árbol filogenético original de secuencias de *16S rRNA* del género *Bacillus* y cepas de *Bt* aisladas. El árbol Neighbor-joining fue construido a partir del alineamiento entre las secuencias de referencia de especies del grupo de *B. cereus sensu lato* (marcadas en azul) y cepas de *Bt* aisladas (en rojo), usando el programa MEGA-X. El bootstrap tuvo un valor de 1000 réplicas y sus valores se muestran en las ramas. La barra horizontal representa la escala de las distancias evolutivas correspondiente a 0.1 sustituciones por posición o 10% de diferencia en las secuencias.

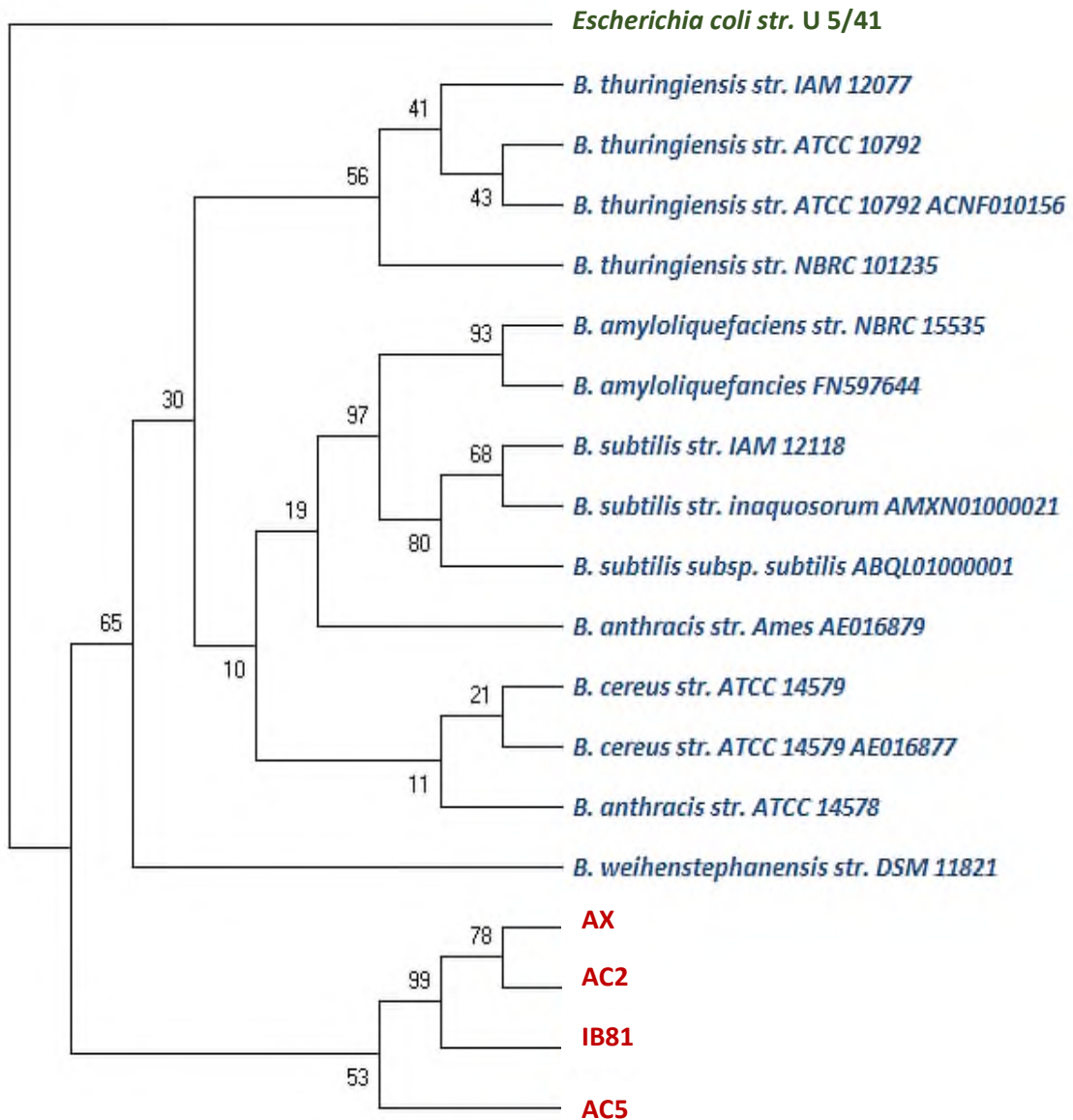


Figura 27. Árbol filogenético de consenso bootstrap de secuencias de *16S rRNA* del género *Bacillus* y cepas de *Bt* aisladas. El árbol Neighbor-joining fue construido a partir del alineamiento entre las secuencias de referencia de la base de datos (marcadas en azul) y cepas de *Bt* aisladas (en rojo), usando el programa MEGA-X. El bootstrap tuvo un valor 1000 réplicas; el porcentaje de árboles replicados se muestran junto a las ramas.

Como se mencionó anteriormente, probablemente la longitud de las secuencias de los productos de amplificación influyó para obtener una discriminación insuficiente en los análisis filogenéticos, pues a pesar de saber bioquímicamente que las cepas sí pertenecen a *Bt* por la producción de proteínas cristalinas (Cruz-Nolasco, 2014), los árboles filogenéticos contaron con la información insuficiente para clasificar a las cepas de *Bt* aisladas. Por estas razones se decidió no tomar en cuenta para la identificación las cepas restantes A24 y A5.

Los resultados de la secuenciación del gen *gmk* de las 10 cepas seleccionadas de *Bt* fueron comparadas con 39 secuencias de serovares de *Bt* de las bases de datos del NCBI, mostradas en la Tabla 6. En el programa MEGA-X se realizó un alineamiento múltiple con CLUSTAL W con ambos grupos de secuencias y se prosiguió su análisis con la realización del árbol filogenético, para determinar la relación de las cepas aisladas de *Bt* con las variedades de referencia en las bases de datos bioinformáticos.

Tabla 6. Serovares y cepas de *Bt* publicadas en NCBI

Especie	Número de acceso en NCBI
<i>Bt</i> serovar <i>tolworthi</i>	AP014864.1
<i>Bt</i> HD-771	CP003752.1
<i>Bt</i> HD1002	CP009351.1
<i>Bt</i> strain ATCC 10792	CP020754.1
<i>Bt</i> strain KNU-07	CP016588.1
<i>Bt</i> serovar <i>mexicanensis</i> str. IP-T27 001	JQ250660.1
<i>Bt</i> strain QZL38	CP032608.1
<i>Bt</i> strain C25	CP022345.1
<i>Bt</i> strain YWC2-8	CP013055.1
<i>Bt</i> strain YC-10	CP011349.1
<i>Bt</i> serovar <i>kurstaki</i> strain HD 1	CP010005.1
<i>Bt</i> serovar <i>kurstaki</i> str. YBT-1520	CP007607.1
<i>Bt</i> serovar <i>chinensis</i> CT-43	CP001907.1
<i>Bt</i> Bt407	CP003889.1
<i>Bt</i> serovar <i>bt</i> str. IS5056	CP004123.1
<i>Bt</i> YBT-1518	CP005935.1
<i>Bt</i> strain MYBT18246	CP015350.1
<i>Bt</i> serovar <i>finitimus</i> YBT-020	CP002508.1

Continúa...

Continuación...

<i>Bt</i> strain XL6	CP013000.1
<i>Bt</i> strain CTC	CP013274.1
<i>Bt</i> MC28	CP003687.1
<i>Bt</i> HD-789	CP003763.1
<i>Bt</i> serovar <i>morrisoni</i> strain BGSC 4AA1	CP010577.1
<i>Bt</i> strain HS18-1	CP012099.1
<i>Bt</i> serovar <i>israelensis</i> strain AM65-52	CP013275.1
<i>Bt</i> strain HD12	CP014847.1
<i>Bt</i> serovar <i>alesti</i> strain BGSC 4C1	CP015176.1
<i>Bt</i> strain L-7601	CP020002.1
<i>Bt</i> BMB171	CP001903.1
<i>Bt</i> serovar <i>kurstaki</i> str. HD73	CP004069.1
<i>Bt</i> serovar <i>kurstaki</i> str. YBT-1520	CP004858.1
<i>Bt</i> serovar <i>kurstaki</i> str. HD-1	CP004870.1
<i>Bt</i> serovar <i>indiana</i> strain HD521	CP010106.1
<i>Bt</i> strain Bt185	CP014282.1
<i>Bt</i> strain C15	CP021436.1
<i>Bt</i> strain YGd22-03	CP019230.1
<i>Bt</i> serovar <i>coreanensis</i> strain ST7	CP016194.1

En la Figura 28 se muestra el árbol filogenético original como resultado del alineamiento múltiple, el cual representa al de mayor verosimilitud o el de mejor ajuste acorde a los datos ingresados. Para su análisis, el árbol se dividió en dos grupos: Clados I y II. Con base a esta denominación, el Clado II muestra una distintiva bifurcación que relaciona filogenéticamente a la cepa A34 con el resto de los subgrupos posteriores al clado, compartiendo este último subconjunto, un porcentaje de bootstrap de 32%. De acuerdo con Felsenstein, 1985, un grupo de secuencias muestra significancia estadística cuando obtiene valores de bootstrap mayores a 95%; otros parámetros menos estrictos, consideran óptimos los valores a partir del 50%. En este sentido, se menciona que las cepas AX y HD1 tienen una relación filogenética muy probable en un 70%, y en un porcentaje por debajo del 50% las cepas AC5, A10 y A24. Particularmente estas últimas cepas, junto con AX y HD1, mantienen un agrupamiento de forma independiente entre sí, y al no mostrar una relación directa con alguna de las cepas de referencia, es posible que pertenezcan a serovares que todavía no se encuentran en la base de datos; sin embargo, debido al porcentaje que

presentan, pudo deberse simplemente por combinación al azar, ya que la probabilidad alta de ser correctos, son los valores de bootstrap que más tiendan a 100%.

Por otro lado, la cepa AC3 muestra relación con *Bt* serovar *finitimus* YBT-020 con una probabilidad del 65%, y también con las cepas de referencia XL6 y CTC; IB81 muestra relación directa con *Bt* MC28 en un 74% y HD73 con los serovares *indiana*, *kurstaki* str. HD73, *kurstaki* str. YBT-1520 y *coreanensis* str. ST7 en un 24%, basándose en el valor de su clado principal.

La particularidad que presenta la cepa A34 en el árbol filogenético original de la Figura 28 es reflejarse como una cepa independiente y emparentada con el resto de las cepas problema y serovares de referencia del Clado II. Es posible que se trate de una cepa no referenciada en la base de datos. Recientemente en el grupo de investigación, se encontró que A34 alcanza su velocidad máxima de crecimiento en menor tiempo (25 h) y genera cristales de menor tamaño en la fase de esporulación respecto a otras cepas de *Bt* mencionadas por Cruz-Nolasco, 2014. Además, se lograron identificar secuencias polipeptídicas a partir de los cristales proteicos de *Bt* que presentaron actividad antiproliferativa contra líneas celulares de cáncer humano. Los resultados esperados implicaban en la obtención de péptidos pertenecientes a proteínas parasporinas; sin embargo, se obtuvo secuencias con altos porcentajes de homología (>95%) con las proteínas piruvato cinasa y formiato acetil-transferasa, importantes en el metabolismo primario celular (Manzano-Reyes, 2019).

La correlación de los resultados por Manzano-Reyes, 2019, con los obtenidos en las relaciones filogenéticas en este trabajo, atribuyen características importantes y distinguibles de A34 dentro del grupo de cepas de *Bt* aisladas en la región del Papaloapan; esto puede generar el punto de partida para realizar una caracterización exhaustiva con las cepas aisladas restantes: el conocimiento de su ubicación en árboles filogenéticos, aunado a la determinación de la actividad biológica de las proteínas cristalinas, ampliaría la posibilidad para asignarles aplicaciones para control biológico o como tratamiento antiproliferativo en células cancerosas, entre otras que quizá estén por descubrir, ya que una de las características de *Bt* para la formación de sus proteínas cristal es la ecología donde se desarrolla. Por ello, la Cuenca de Papaloapan es un nicho de estudio interesante para el descubrimiento de nuevas cepas de *Bt* endémicas de la región.



Figura 28. Árbol filogenético original de secuencias de *gmk* de serovares y cepas de *Bt* contra cepas de *Bt* aisladas. El árbol Neighbor-joining fue construido a partir del alineamiento entre las secuencias de referencia de la base de datos (marcadas en azul) y cepas de *Bt* aisladas (en rojo), usando el programa MEGA-X. El bootstrap tuvo un valor 1000 réplicas; el porcentaje de bootstrap se muestra junto a las ramas.

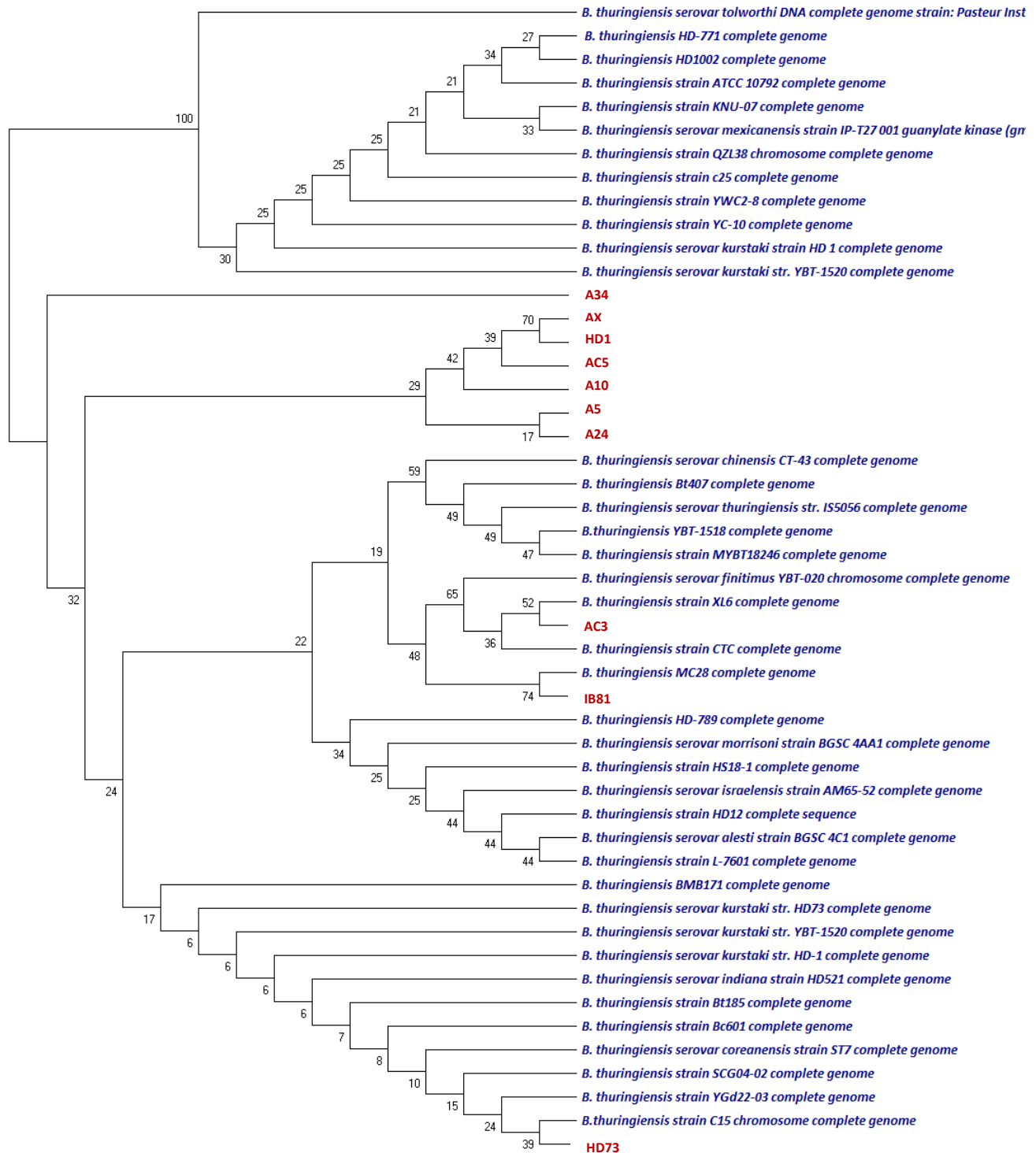


Figura 29. Árbol filogenético de consenso bootstrap de secuencias de *gmk* de serovares y cepas de *Bt* contra cepas de *Bt* aisladas. El árbol Neighbor-joining fue construido a partir del alineamiento entre las secuencias de referencia de la base de datos (marcadas en azul) y cepas de *Bt* aisladas (en rojo), usando el programa MEGA-X. El bootstrap tuvo un valor 1000 réplicas; el porcentaje de árboles replicados se muestran junto a las ramas.

8 Conclusión

El gen *16S rRNA* no fue suficiente para discriminar entre cepas de *Bt* aisladas de la región del Papaloapan, debido a los tamaños de amplicón obtenidos de 285 pb en cada una de ellas. A pesar que el gen *16S rRNA* no logra discriminar filogenéticamente entre serovares, un diseño diferente de oligonucleótidos ayudaría a confirmar y validar que las cepas aisladas a estudiar, sí pertenecen a *Bt* y no a otras de mismo género de *Bacillus*.

El gen *gmk* logró relacionar filogenéticamente la cepa AC3 con *Bt* serovar *finitimus* YBT-020 con una probabilidad del 65% y también con las cepas de referencia *Bt* str. XL6 y *Bt* str. CTC; IB81 mostró relación directa con *Bt* MC28 en un 74% y HD73 con los serovares *indiana*, *kurstaki* str. HD73, *kurstaki* str. YBT-1520 y *coreanensis* str. ST7 en un 24%. Las cepas A5, AX, HD1, AC5, A10 y A24 evidenciaron una agrupación independiente al no mostrar una relación directa con algunos de los serovares y cepas de referencia del árbol filogenético; por tal motivo, el uso de otros genes altamente conservados podría ampliar el grado de discriminación para las cepas que no lograron establecerse en una agrupación definida.

La cepa A34 se mostró como un aislado independiente, cuya posición en el árbol filogenético indicó una relación filogenética con el resto de las cepas problema y serovares de referencia del Clado II del árbol filogenético original. Con ello, es posible que por las características medioambientales de la región del Papaloapan, A34 pueda tratarse de una nueva cepa aún no reportada, debido a las características particulares que presenta en su cinética de crecimiento y composición de sus proteínas cristalinas con respecto a otras cepas de *Bt* referenciadas.

9 Perspectivas

Los sistemas para establecer relaciones filogenéticas para caracterizar y clasificar nuevas cepas, definen el uso de genes altamente conservados y de técnicas moleculares con alta sensibilidad y especificidad, apoyado de las bases de datos de genomas y herramientas bioinformáticas. Con ello, queda como perspectiva dar seguimiento a este trabajo de investigación con base a las siguientes propuestas:

- I. Caracterizar las cepas de *Bt* aisladas de la Cuenca del Papaloapan empleando los genes altamente conservados *glpF*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA* y *tpi*, referenciados en las bases de datos de PubMLST para el grupo de *B. cereus*, así como *rpoB*, *gyrB* y genes *Cry*, para establecer en conjunto relaciones filogenéticas con serovares de referencia.
- II. Emplear las técnicas moleculares de PCR multiplex y tiempo real para la amplificación de genes de manera simultánea, sustituyendo a la PCR convencional o de punto final que implica la elaboración de geles de agarosa; con ello, se evitarían riesgos de dimerización entre las bases de timina, así como de posibles contaminaciones por reactivos y bajos rendimientos de DNA durante la purificación de las bandas amplificadas.
- III. Realizar un banco interno institucional de cepas de *Bt* aisladas de la región del Papaloapan caracterizadas mediante la identificación de sus variaciones de secuencias o ST a través de la técnica de Tipificación multilocus de secuencias.
- IV. Caracterizar serovares de todas las cepas *Bt* aisladas de la región en función de la actividad biológica que desempeñan, acorde a la naturaleza de la composición de sus proteínas cristalinas.

10 Referencias bibliográficas

- Akiba, Toshihiko & Okumura, Shiro. (2016). Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 142.10-16
- Ito, A., Sasaguri, Y., Kitada, S., Yoshitomo, K., Kyoko, K., Masutomi, K., Mizuki, E., Akao T., & Michio Ohba. (2004). A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 279(20):21282-6
- Aronson, A. I., & Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: Unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), 1-8.
- Beegle, C. C. (1992). Invitation paper (C.P. alexander fund): History of *Bacillus thuringiensis* berliner research and development. *The Canadian Entomologist*, 124(4), 587-616.
- Berliner, E. (1915). About the flacherie the flour moth caterpillar (*Ephestia kuhniella*) and its pathogen *Bacillus thuringiensis*, *Z.*, 2, 29–56.
- Brasseur, K., Auger, P., Asselin, E., Parent, S., Côté, J. C., Sirois, M. (2015). Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. *PLoS ONE* 10(8): e0135106.
- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B. I., Rodríguez-Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. (2013). Evolution of *Bacillus thuringiensis* cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, 6(1), 17-26.
- Cerón, J. (2004). Productos comerciales: nativos y recombinantes. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia., 123-147.
- Chen, M. L., & Tsen, H. Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 912-919.
- Choma, C. T., & Kaplan, H. (1992). *Bacillus thuringiensis* crystal protein: effect of chemical modification of the cysteine and lysine residues. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59(1), 75–80.

Cruz-Nolasco, A. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry (Tesis de licenciatura). Universidad del Papaloapan, México.

Cruz-Nolasco, A. (2017). Síntesis de nanoliposomas que contienen parasporinas de *Bacillus thuringiensis* con actividad antiproliferativa (Tesis de maestría). Universidad del Papaloapan, México.

de Barjac, H., & Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de Bacillus du type *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*, 7(1), 5–31.

Drewnowska, J. M., & Swiecicka, I. (2013). Eco-genetic structure of *Bacillus cereus sensu lato* populations from different environments in Northeastern Poland. *PLoS ONE*, 8(12).

Giffel, M.C., Beumer, R., Klijn, N., Wagendorp, A. & Rombouts, F. (1997). Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS microbiology letters*. 146. 47-51.

Glare, T. R., & O'Callaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester ; New York : Wiley.

González-Cabrera J. (2001). Plantas transgénicas con la capacidad insecticida de *Bacillus thuringiensis*. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas, 169-87.

Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2627–2630.

Ishiwata, S.C. (1901). One kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sans Kaiho*. 114, 1–5.

Jordan, R. C., Daniels, T. E., Greenspan, J. S., & Regezi, J. A. (2001). Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part I: molecular methods. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 92(6), 650–669.

Khetan, S. (2001). Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. *Microbial Pest Control*, Khetan editor, 14.

- Lecadet, M. M., Frachon, E., Cosmao Dumanoir, V., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., & Thiéry, I. (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 660-672.
- Lee, D., Katayama, H., Akao, T., Maeda, M., Tanaka, R., Yamashita, S., Ohba, M. (2001). A 28 kDa protein of the *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547(1), 57–63.
- Li, J., Pandelakis, A.K., Ellar, D.J. (1996). Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*. 257:129–152.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3140-3145.
- Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., & Park, Y. S. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 477–486.
- Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 7(4), 625–634.
- Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, T., & Mizuki, E. (2010). Three Cry Toxins in Two Types from *Bacillus thuringiensis* Strain M019 Preferentially Kill Human Hepatocyte Cancer and Uterus Cervix Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(3), 494–498.
- Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, 29(1), 427-433.
- Petit, L., Gibert, M., Gouch, A., Bens, M., Vandewalle, A., & Popoff, M. R. (2003). *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. *Cellular Microbiology*, 5(3), 155–164.

- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 71(2), 255–281.
- Rippon, J.W. (1990). Hialohifomicosis, pitiosis, micosis diversas y raras, algosis. In: Rippon JW. *McGraw-Hill*. Tratado de micología médica. Hongos y actinomicetos patógenos. México: Interamericana. 790.
- Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R., & Je, Y. H. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 547–559.
- Ryan, K. J., Ray, C. G., & Sherris, J. C. (2010). *Sherris medical microbiology*. (5th ed). New York: McGraw Hill Medical.
- Ryan, K. J., Ray, C. G., & Sherris, J. C., (2004). *Sherris medical microbiology : an introduction to infectious diseases* (4th ed). New York : McGraw-Hill.
- Sadava, D., & Purves, W. H. (2009). *Vida: La ciencia de la biología*. (8th ed). Médica Panamericana.
- Sanchis, V., Lereclus, D., Menou, G., Chaufaux, J., & Lecadet, M. M. (1988). Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29. *Molecular Microbiology*, 2(3), 393–404.
- Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación. (2017, mayo 12). Recuperado el 2 de septiembre de 2018, de <https://revistageneticamedica.com>
- Sauka, D., & Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40 (2), 124-140.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2. *Journal of Basic Microbiology*. 27: 398-398.
- Soufiane, B., & Côté, J. C. (2009). Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, gyrB and aroE gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95(1), 33–45.

Tiewisiri, K., & Angsuthanasombat, C. (2007). Structurally Conserved Aromaticity of Tyr249 and Phe264 in Helix 7 is important for Toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba Toxin. *BMB Reports*, 40(2), 163–171.

Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J.-L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), 1–12.

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos De Bioquímica*, Ed. Médica Panamericana.

Wang, Aisuo & Ash, Gavin J., (2015). Whole genome phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). *Scientific Reports*, 5, 13644.

Wang, K., Shu, C., Soberón, M., Bravo, A., & Zhang, J. (2018). Systematic characterization of *Bacillus* genetic stock center *Bacillus thuringiensis* strains using Multi-locus sequence typing. *Journal of Invertebrate Pathology*, 155, 5-13.

Whalon, M. E., & Wingerd, B. A. (2003). *Bacillus thuringiensis*: mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4), 200–211.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221–271.

Yamamoto, S., & Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1104–1109

11 Anexos

11.1 Amplificación del gen *aroE*

Con la finalidad de complementar el análisis de filogenia con genes altamente conservados, se decidió como parte adicional a este trabajo amplificar el gen *aroE* en las 10 cepas de *Bt* (AX, AC2, AC3, AC5, A5, A10, A24, A34, IB81 y HD1).

Primeramente, se realizó un análisis bioinformático empleando la secuencia de NCBI en formato FASTA de *Bt* str. YWC2-8 (NZ_CP013055.1) y en Microsoft Word® se realizó un alineamiento de los oligonucleótidos *aroE*-F1 y *aroE*-R1, tomados de Soufiane y Coté *et al.*, (2009), para determinar el tamaño de amplicón. Dicha longitud mostró un fragmento de 755 pb (Figura 30).

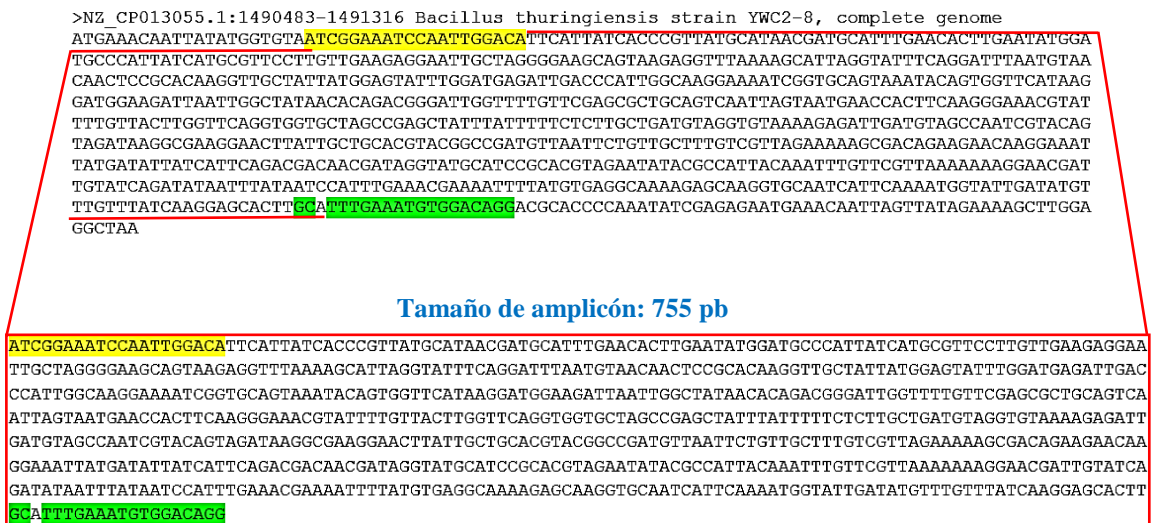
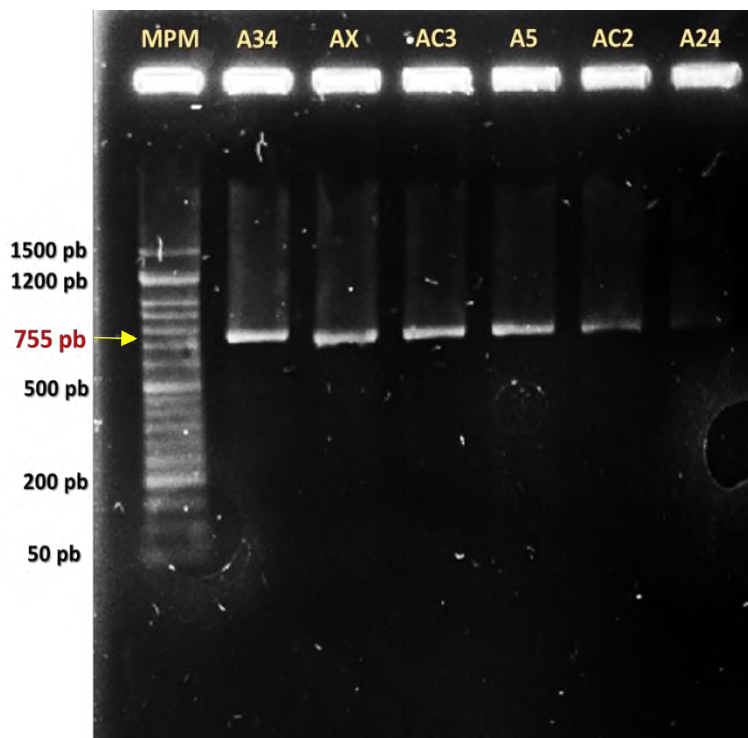


Figura 30. Alineamiento de los oligonucleótidos de *aroE* en secuencias de referencia. Se ubican los oligonucleótidos *aroE*-F1 (amarillo) y *aroE*-R1 (verde) en la secuencia de referencia del gen *aroE* de la cepa YWC2-8 de *Bt*.

Para la reacción de PCR se utilizaron las condiciones descritas en la Tabla 7, y como resultado tras el análisis en gel de electroforesis, se obtuvo bandas amplificadas de 755 pb (Figura 31) para las cepas A34, AX, AC3, A5, AC2 y A24; el tamaño de amplicón fue coincidente con lo reportado por Soufiane y Coté en 2009, modificando únicamente el tiempo de alineamiento a 45 s. Finalizando las reacciones, se prosigió a la purificación de los productos de PCR de las 10 cepas empleando el Kit comercial Epigentek Isolation® y se cuantificaron por espectrofotometría en NanoDrop®. Los datos de las concentraciones se resumen en la Tabla 8.

Tabla 7. Condiciones de reacción de PCR del gen *aroE*

Gen	Oligonucleótidos	Condiciones de reacción
<i>aroE</i> Soufiane y Cotê et al., 2009	aroE-F1 (5'-ATCGGAAATCCAATTGGACA-3') aroE-R1 (5'-CCTGTCCACATTTCAAACGC-3')	Desnaturalización inicial: 95°C por 5 min. 30 ciclos Desnaturalización: 95°C por 60 s. Alineamiento: 47°C por 45 s. Extensión: 72°C por 60 Extensión final: 72°C por 7 min

Tabla 8. Cuantificación de DNA purificado del gen *aroE*

Cepa	Concentración (ng/ μ L)
	<i>aroE</i>
A34	9.81
A24	5.5
HD1	6.2
A5	8.5
AC2	7.1
AC3	9.4
AC5	8.5
IB81	8.0
AX	6.0
A10	7.2

Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de la amplificación por PCR del gen *aroE*. Se muestran bandas amplificadas de ~750 pb en las cepas A34, AX, AC3, A5, AC2 y A24.

Para su secuenciación por electroforesis capilar basada en Sanger en el Instituto de Biotecnología, las muestras se prepararon en un volumen total de 16 μL en un microtubo para PCR, conteniendo 100 ng de DNA purificado de cada cepa y 1 μL de los oligonucleótidos correspondientes; sin embargo, los electroferogramas recibidos como resultados de la secuenciación, no mostraron presencia de nucleótidos (Figura 32). Por este motivo, a pesar de una concentración y calidad suficientes en los purificados, se decidió no proseguir con el uso de este gen para las cepas restantes.

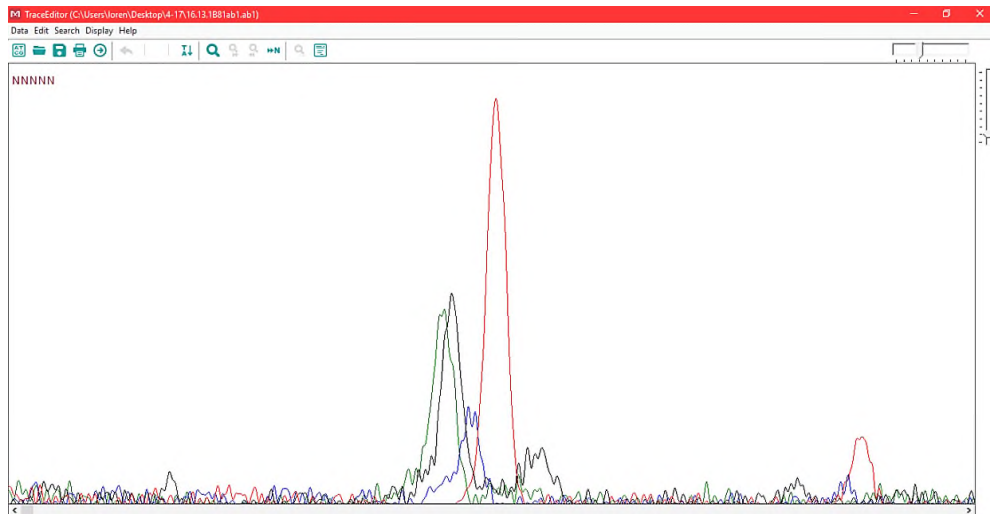


Figura 32. Electroferograma de la cepa IB81 del gen *aroE*. El resultado obtenido de la secuenciación del gen *aroE* para la cepa IB81, mostró ausencia de nucleótidos, indicados como N.

La metodología empleada para el análisis del gen *aroE* permitió solamente obtener amplificadores de las cepas aisladas de *Bt*; no obstante, queda como alternativa emplear, en los posteriores estudios, protocolos diferentes de purificación de DNA basados en precipitación con isopropanol, sales y enzimas exonucleasas directamente sobre los productos de PCR. De este modo, se obtendrían mayores rendimientos de concentración de DNA respecto a los protocolos basados a partir de geles de agarosa, evitándose también posibles interferencias de los reactivos empleados que puedan afectar la pureza y, por consecuencia, la secuenciación.



Este trabajo fue presentado en modalidad cartel en **El Primer Congreso Nacional Estudiantil de Bioquímica y Biología Molecular “Dra. Yolanda Cocotle Ronzón”**, llevado a cabo los días 11 y 12 de marzo de 2019 en Xalapa, Veracruz, México.