



Caracterización de cepas presuntivas de *B. thuringiensis* encontradas en la filoesfera del árbol de aguacate, de Sacatepéquez y Alta Verapaz

Dinora Roche Recinos

Bioquímica y microbióloga, MSc. Biotecnología

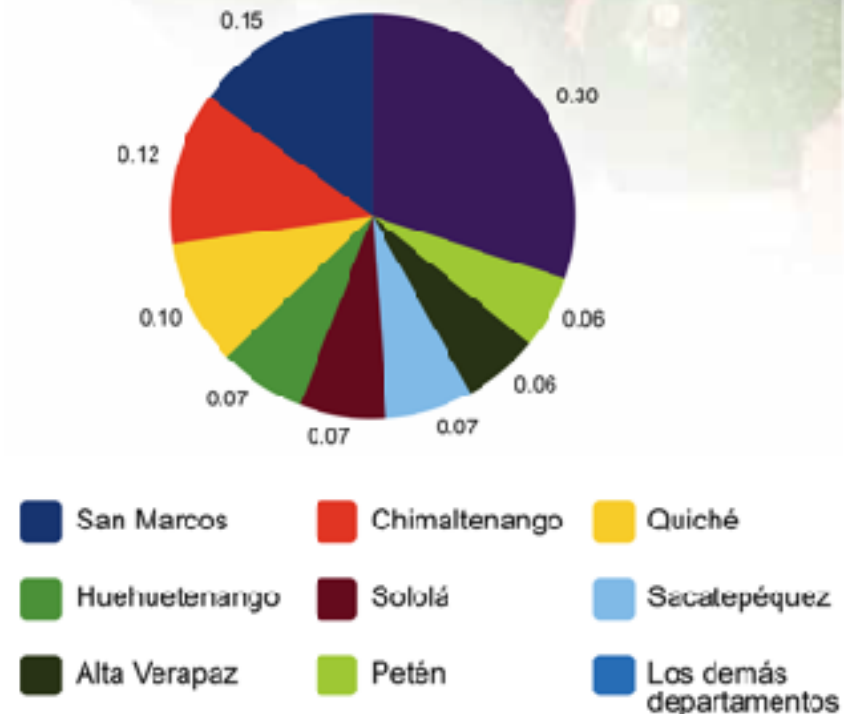
LPV-UVG



Cultivo de aguacate

- El aguacate constituye uno de los principales cultivos de exportación.
- La producción en Sacatepéquez es del 7% y en Alta Verapaz del 6%.

Distribución de la producción a nivel nacional (%):



FUENTE: DIPLAN-MAGA con datos INE.

DIPLAN-MAGA con datos de INE, 2015



Cultivo Aguacate

Aspectos económicos

Empleo directo en campo (jornales/año 2014): 1,184,000

Equivalente en empleos permanentes: 4,229

Fuente: Estimaciones DIPLAN-MAGA, con datos BANGUAT.

Nota: Cifras Estimadas.

- En 2014, la producción de aguacate alcanza alrededor de 2,295,308 quintales anuales (DIPLAN-MAGA con datos de BANGUAT, 2015).

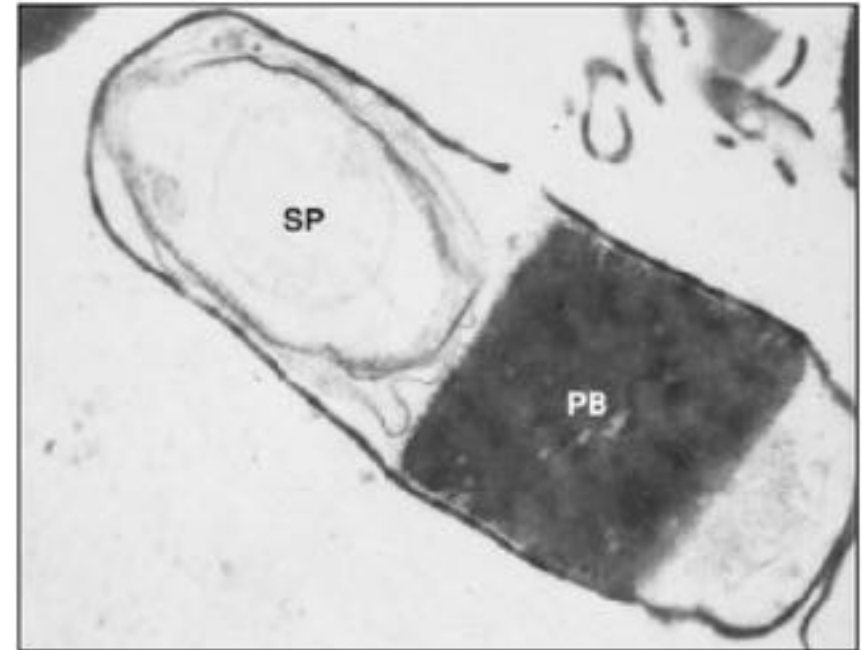


B. thuringiensis

- *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram positivo, espora formadora y móvil (flagelos peritricos).
- Existen más de 58 serotipos (variedades o subespecies) y miles de cepas aisladas.
- Cada cepa produce una toxina única que es efectiva en contra de un grupo específico de insectos.

B. thuringiensis

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





Toxinas

- Las δ -endotoxinas sintetizadas por Bt incluyen a las citolíticas (*Cyt*) y las cristalinas (*Cry*), producidas durante el inicio de la esporulación y la fase estacionaria como inclusiones parasporales.
- Durante la fase de crecimiento vegetativo Bt sintetiza otras proteínas insecticidas. Secretadas al medio de cultivo. Designadas como proteínas vegetativas insecticidas (Vegetative insecticidal proteins, *Vip*) y las proteínas insecticidas secretadas (Secreted insecticidal protein, *Sip*).

Cry1A-K; Cry2A
Cry73; Cry8D
Cry9A-C; Cry15A
Cry22A; Cry32A
Cry51A



Lepidoptera



Diptera

Cry1A-C; Cry2A
Cry4A-B; Cry10
Cry11A-B; Cry16A
Cry19A-B; Cry20A
Cry24C; Cry27A
Cry32B-D; Cry39A
Cry44A; Cry47A
Cry48A; Cry49A
Cyt1A-B; Cyt2A-B



Coleoptera

Cry1B, I; Cry3A-C; Cry7A
Cry8A-G; Cry9D; Cry14A
Cry18A; Cry22A-B; Cry23A
Cry34A-B; Cry35A-B; Cry36A
Cry37A; Cry43A-B; Cry55A
Cyt1A; Cyt12C

Cry5A-B; Cry6A-B
Cry12A; Cry13A
Cry14A; Cry21A
Cry55A

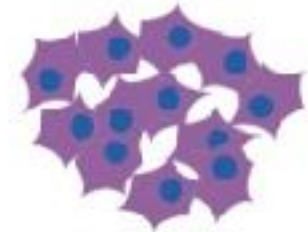


Rhabditida

δ-Endotoxins



Cry31A
Cry41A
Cry42A
Cry45A
Cry46A



**Human-cancer
cells**

Cry2A
Cry3A
Cry11A



Hemiptera

Cry3A
Cry5A
Cry22A



Hymenoptera

Cry1A₃



Gastropoda



Modo de acción

- Una vez ingeridas por insectos los cristales son solubilizados en el intestino medio y las proteínas son activadas proteolíticamente por las proteasas de los insectos y se unen a los receptores de membrana, llevando a la disrupción celular y a la muerte del insecto.

Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007 Mar 15; 49(4):423-35.

Donovan WP, Engleman JT, Donovan JC, Baum JA, Bunkers GJ, Chi DJ, Clinton WP, English L, Heck GR, Ilagan OM, Krasomil-Osterfeld KC, Pitkin JW, Roberts JK, Walters MR. 2006. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72(4): 713-9.

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28; 93(11):5389-94.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325. <http://doi.org/10.3390/toxins6123296>

Warren G.W., Koziel M.G., Mullins M.A., Nye G.J., Carr B., Desai N.M., Kostichka K., Duck N.B., Estruch J.J. Auxiliary Proteins for Enhancing the Insecticidal Activity of Pesticidal Proteins. 5,770,696. U.S. Patent. 1998 Jun 23.



B. thuringiensis

- Bt fue aislada en 1901 en Japón e investigada en 1911 en Alemania, con una muestra enviada desde Thuringia en Alemania.
- Utilizada como un insecticida comercial (Sporeine) en el año 1938 en Francia, y en Estados Unidos en la década de los cincuentas.



Polimorfismo conformacional de hebra única (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP)

- Desnaturalización de productos de PCR, para identificar mutaciones puntuales en una secuencia de ADN amplificado.
- Se usa para secuencias de ADN de 150-250 pb, en donde 70-90% de las sustituciones de una sola base son aparentes usando la técnica.



SSCP, cont., ...

- Una mutación puntual puede alterar la conformación de una hebra simple de ADN causando cambios en su movilidad, en geles no desnaturizantes de poliacrilamida.
- Los resultados pueden visualizarse de varias formas, en este estudio se usó tinción de plata.



Objetivos

- GENERAL
 - Comprobar la existencia de presuntas cepas nativas guatemaltecas de *B. thuringiensis* en la filoesfera del árbol de aguacate variedad Hass.
- ESPECÍFICOS
 - Caracterización morfológica de las colonias de las cepas presuntivas.
 - Obtención de perfiles de la región 16S del ADN ribosomal por SSCP.



Metodología

- **Muestreo**
 - Material vegetal:
Follaje y hojarasca.
 - Suelo
- **Aislamiento de cepas (muestra)**
- **Identificación microscópica de cada colonia seleccionada**
 - Tinción de Gram
 - Azul de Coomassie
- **Caracterización genética**
 - Extracción de ADN
 - PCR
 - Desnaturalización del ADN
- **Análisis de resultados**
 - SSCP/ PAGE
 - Tinción de plata
 - Comparación perfiles



Tipo de estudio

- Investigación no experimental de tipo transversal descriptiva.
- Se recolectaron datos en un solo momento (tiempo único). Su propósito fue describir variables y analizar su recurrencia o interrelación en un momento dado.

Índice de Simpson (D)




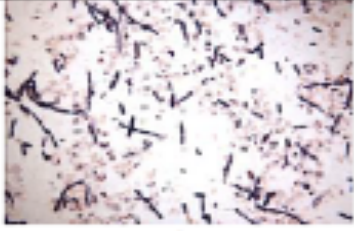
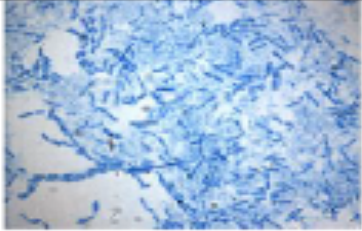

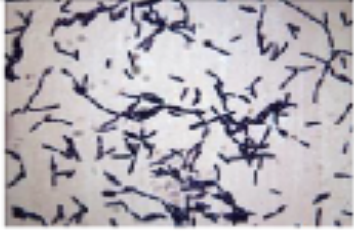

- Es una medida de la probabilidad de que dos individuos al azar seleccionados de una muestra pertenezcan a la misma especie (o alguna otra categoría diferente de especie).
- Con este índice, 0 representa una diversidad infinita y 1, que no hay diversidad. Al tener un mayor valor de D, hay una menor diversidad.
- D es un estimado de la verdadera diversidad de una población basado en una muestra de n individuos.



RESULTADOS

Morfología de colonia



Muestra Muestra de Suelo	Colonia (Número)	Morfología de la Colonia	Tinción Gram	Tinción con Azul de Coomassie
1S2	1	 Color: Blanca. Apariencia: Mucóide, lisa. Borde: Lobulado. Elevación: Plana.	 -	 -
	2	 Color: Blanca. Apariencia: Mucóide, lisa. Borde: Lobulado. Elevación: Plana.	 +	 +

Las muestras se codificaron de la siguiente manera:

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

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

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

- Los aislados de *B. thuringiensis*, de agar nutritivo e incubadas a $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ tienen colonias con morfología: circular, blancas, planas, onduladas o enteras.

Tinción Azul Coomassie



- 98 positivos de 150 aislados (1er muestreo, Sacatepéquez).
- 73 positivos de 146 aislados (2do muestreo, Alta Verapaz).
 - **TOTAL:** 171 presuntas cepas de Bt

SSCP, cont., ...

PCR No.6 Muestras con ADN puro sin dilución (se corrió el 30/01)

GEL 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	1 Kb	ctrl neg	3S14	4S15	8S11	8S12	8S13	9S12	9S13	10S12	blank	6106Bt	6112Bt	Dipel	25 bp

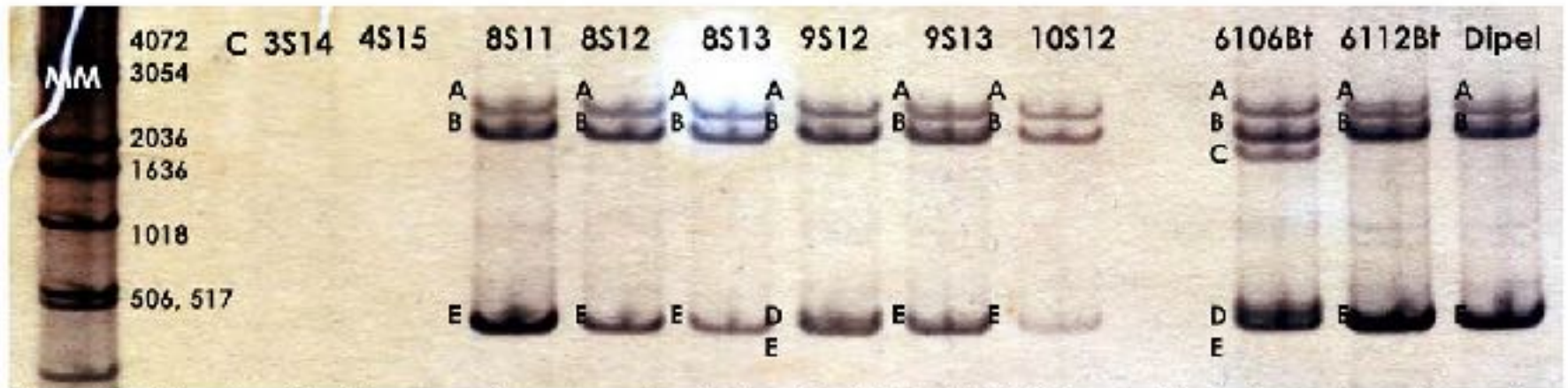


Figura 16: Visualización de las mutaciones puntuales de la región 16S del ADN ribosómico de *B. thuringiensis*, luego de la optimización del protocolo de la técnica de SSCP. MM) marcador molecular 1Kb INVITROGEN; C) control negativo; Muestras: 3S14, 4S15, 8S11, 8S12, 8S13, 9S12, 9S13 y 10S12; Controles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

- Prueba de SSCP a 164 aislados (que amplificaron) de 171 positivos.



RESULTADOS 1ER MUESTREO, SACATEPÉQUEZ



Cuadro 22: Muestras Suelo Primer Muestreo

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

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

Cuadro 23: Muestras Hojarasca Primer Muestreo

Variantes Electroforéticas	Código Asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	$p \geq 3$	$p \geq 2$
EBA	A	10	0.333	9	90	0.037	0.111
ECBA	B	9	0.300	8	72	0.027	0.090
EDCBA	C	4	0.133	3	12	0.002	0.018
EDCBAA0	E	1	0.033	0	0	0.000	0.001
EBA00	F	5	0.167	4	20	0.005	0.028
EB	G	1	0.033	0	0	0.000	0.001
	total	30	1	24	194	0.071	0.249

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



Cuadro 24: Muestras Follaje Primer Muestreo

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

Índice de Simpson	0.392
Índice de diversidad de Simpson	0.608
s^2	0.003
Límite de confianza inferior	0.280
Límite confianza superior	0.504



RESULTADOS 2DO MUESTREO, ALTA VERAPAZ



Cuadro 25: Muestras Suelo Segundo Muestreo

Variantes Electroforéticas	Código Asignado	Cantidad	p_i	n_j	$n(n_j)$	p_{i3}	p_{i2}
EBA	A	5	0.156	4	20	0.004	0.024
ECBA	B	12	0.375	11	132	0.053	0.141
EDCBA	C	1	0.031	0	0	0.000	0.001
EDBA	D	3	0.094	2	6	0.001	0.005
BA	H	5	0.156	4	20	0.004	0.024
EBAA0A1	I	3	0.094	2	6	0.001	0.005
EBAA1A2A4A5	J	1	0.031	0	0	0.000	0.001
EBAA2A4A5	K	1	0.031	0	0	0.000	0.001
EBAA0A1A2A3	L	1	0.031	0	0	0.000	0.001
	total	32	1	23	184	0.062	0.211

Índice de Simpson	0.185
Índice de diversidad de Simpson	0.815
s^2	0.002
Límite de confianza inferior	0.092
Límite confianza superior	0.279



Cuadro 26: Muestras Hojarasca Segundo Muestreo

Variante Electroforética	Código Asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	p_{i2}	p_{i1}
EBA	A	8	0.667	7	56	0.296	0.444
EDCBA	C	1	0.083	0	0	0.001	0.007
EDBA	D	1	0.083	0	0	0.001	0.007
EBAA0	F	1	0.083	0	0	0.001	0.007
BA	H	1	0.083	0	0	0.001	0.007
	total	12	1	7	56	0.299	0.472

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

Cuadro 27: Muestras Follaje Segundo Muestreo

Variante Electroforética	Código Asignado	Cantidad	p_i	$n-1$	$n(n-1)$	p_{i2}	p_{i1}
EBA	A	18	0.692	17	306	0.332	0.479
EDBA	D	3	0.115	2	6	0.002	0.013
BA	H	5	0.192	4	20	0.007	0.037
	total	26	1	23	332	0.340	0.530

Índice de Simpson	0.511
Índice de diversidad de Simpson	0.489
s^2	0.009
Límite de confianza inferior	0.319
Límite confianza superior	0.703



DIVERSIDAD (ÍNDICE DE SIMPSON)



Cuadro 28: Índice de Simpson para todas las muestras

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

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

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

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

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



Conclusiones

- Se obtuvo significativamente una mayor diversidad de variantes genéticas en la muestra de suelo de Alta Verapaz comparado con todas las muestras de ambas regiones, con un índice de Simpson de 18.5% (IC95%, 9-28%) el más bajo en comparación con todas las demás muestras, con una diversidad cercana a infinito.
- Más del 50% de los aislados totales de la finca de Sacatepéquez se encontró, poseían el mismo perfil genético de Dipel, esto no necesariamente indica que sean el mismo tipo de bacteria.



Conclusiones

- La mayor cantidad de cepas mutantes se encontró en el suelo de la región de Alta Verapaz, y se puede inferir que dentro de estas se podrían encontrar las cepas nativas. Analizándose 32 individuos para esa muestra los cuales presentaron 9 variantes genéticas.
- *Bt* representa una alternativa para el manejo integrado de plagas, porque reduce la utilización de insecticidas químicos.



Conclusiones

- Su acción no es nociva al medio ambiente, debido a que es altamente selectivo y efectivo, una variedad de *Bt* eliminará un solo tipo de plaga de la cosecha y la proteína remanente es degradada naturalmente bajo la luz del sol.