



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Programa Regional de Posgrado en Biotecnología**  
**Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología**

**Elaboración de un Formulador a Base  
de una Cepa Regional de *Bacillus  
thuringiensis* para el Control de  
*Diatraea considerata***

**T E S I S**

que presenta

**QFB Raquel Camacho Millán**

como requisito para  
obtener el grado de

**Maestría en Ciencias con Orientación  
en Biotecnología Ambiental**

**Director de Tesis**

**Dr Rosalío Ramos Payán**

**Dr Héctor Manuel Cárdenas Cota**

**Culiacán Rosales, Sinaloa, México      Julio 2017**

## **Presentación**

La presente investigación titulada “Elaboración de un Formulado a Base de una Cepa Regional de *Bacillus thuringiensis* para el Control de *Diatraea considerata*” se llevó a cabo en los Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), y en la Universidad Tecnológica de Culiacán (UTC). Los C Dr Rosalío Ramos Payán y Dr Héctor Manuel Cárdenas Cota participaron como Director de tesis. La C QFB Raquel Camacho Millán recibió Beca Nacional por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Posgrado (Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca y el recurso económico brindado para la realización de este estudio a través del proyecto CONACYT-SRE 188060; Fondo: S0016, Convocatoria: SRE 2012-2, Solicitud: 000000000188060, Modalidad: PIDEM.

A la empresa Agrobiológicos del Noroeste (SA de CV) por todo el apoyo que hizo posible que el proyecto fuera realizado.

Al Dr. Rosalío Ramos Payán, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por su inmensa paciencia y haber fungido como mi papá académico. Muchas gracias.

Al Dr. Héctor Manuel Cárdenas Cota, por haberme dado su voto de confianza una vez más, apoyarme en el camino de la investigación y por todos los sabios consejos que me ha dado. Me hace ver la vida de otra manera.

Al Dr. José Geovanni Romero Quintana, porque más que un asesor, ha sido mi amigo incondicional por casi 5 años. Te quiero chino.

A la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina, por todo su apoyo y la confianza puesta en mí. Una mujer digna de admirar.

Al Dr. Luis Javier Mendoza Estrada, por brindarme su amistad y ayudarme para la realización de este proyecto.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Mariana, Ruy, Fernando, Nayeli, Erik, Geraldine, Carlos, Germán, Erika, Eduardo, Aida, Nidia, Marimar, Nora, Juan Carlos, Daniel y Maryelv, gracias por los buenos momentos compartidos, y su apoyo durante los no tan buenos.

A mis amigas Diana, Betty, Marina, Melissa, Rita, Claudia, Gaby, Mafer, Laura, Ana-chan, Faby, Gisela y Grecia, que siempre encuentran la manera de hacerme reír y forman una parte importante de mi vida.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, María Isabel Millán y Cornelio Camacho, que me criaron para ser una persona de bien y me han apoyado para que logre superarme. Gracias por todo su amor.

A mis hermanos Néstor, Víctor y Julio, por su cariño y tratar de estar unidos a pesar de los momentos difíciles.

A mi novio Carlos Pinto Ávila, por demostrarme su amor y no dejar que me dé por vencida. Gracias por estar conmigo en este camino.

En memoria de Thania Denisse Luna Paredes. Te agradezco que hayas sido mi amiga incondicional durante 11 años. Sigo adelante, pero te llevo siempre conmigo. Te amo nena.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	x
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
III. REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
<b>A. CULTIVO DE CAÑA</b>	6
1. Sector cañero en México	6
2. Plagas de la caña de azúcar	7
B. <i>Diatraea considerata</i>	7
1. Ciclo biológico	7
2. Distribución	8
C. <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
1. Características generales	11
2. Proteínas Cry	11
a) Mecanismo de acción de las proteínas Cry	13
b) Especificidad	14
3. Uso de Bt a nivel mundial	14
<b>D. ANTECEDENTES</b>	16
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. OBJETIVOS	22
<b>A. OBJETIVO GENERAL</b>	22
<b>B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
<b>A. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	23
<b>B. MATERIALES</b>	23
1. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
2. Larvas de <i>Diatraea considerata</i>	23

3. Plantas de caña	23
<b>C. MÉTODOS</b>	24
1. Análisis molecular	24
a) Extracción de ADN	24
b) Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	25
c) Identificación de las proteínas Cry	25
2. Bioensayos	27
3. Superficie de respuesta	28
4. Pruebas de invernadero	31
a) Elaboración del formulado	31
b) Aplicación de los tratamientos	34
5. Análisis estadístico	34
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
<b>A. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS</b>	38
<b>B. EFECTIVIDAD DE LAS CEPAS CONTRA <i>D. considerata</i></b>	41
<b>C. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO</b>	43
<b>D. EFECTIVIDAD DEL FORMULADO CONTRA <i>D. considerata</i> EN CULTIVOS DE CAÑA</b>	77
IX. CONCLUSIONES	81
X. BIBLIOGRAFÍA	82
XI. ANEXOS	87
A. Publicaciones	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág.
1	Ciclo biológico de <i>Diatraea</i> .	9
2	Área de distribución de <i>D. considerata</i> en México.	10
3	Resumen del espectro de organismos blanco de las toxinas de Bt.	15
4	Infestación artificial con larvas de <i>Diatraea considerata</i> .	34
5	Integridad del material genético visualizado en un gel de agarosa al 1.5 %.	38
6	Árbol de Neightbor Joining obtenido con el alineamiento de las secuencias del gen rRNA 16S de cada una de las cepas.	39
7	Gráfica de contorno del modelo lineal para el mapeo inicial (células).	54
8	Gráfica 3D del modelo lineal para el mapeo inicial (células).	55
9	Gráfica de contorno del modelo lineal para el primer mapeo (Cry).	56
10	Gráfica 3D del modelo lineal para el mapeo inicial (Cry).	57
11	Gráfica de contorno del modelo cuadrático para el mapeo inicial (células).	58
12	Gráfica 3D del modelo cuadrático para el mapeo inicial (células).	59
13	Gráfica de contorno del modelo cuadrático para el mapeo inicial (Cry).	60
14	Gráfica 3D del modelo cuadrático para el mapeo inicial (Cry).	61
15	Gráfico de contorno del segundo mapeo de superficie de respuesta (Células).	67
16	Gráfico 3D del segundo mapeo de superficie de respuesta (Células).	68
17	Gráfico de contorno del segundo mapeo de superficie de	69

	respuesta (Cry).	
18	Gráfico 3D del segundo mapeo de superficie de respuesta (Cry).	70
19	Tinción Scheaffer-Fulton de las 11 observaciones de superficie de respuesta.	71
20	Perfil proteico de los 7 tratamientos de superficie de respuesta.	72
21	Curva estándar de BSA para densitometría de bandas.	73
22	Perfil proteico de los puntos 5, 6, 7 y 8 del segundo mapeo de superficie de respuesta.	74
23	Curva estándar de BSA para densitometría de bandas.	75
24	Plantas dañadas por tratamiento.	77
25	Monitoreo de las plantas de caña al término del ensayo.	79



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Tratamientos usados en el primer ensayo de superficie de respuesta.	28
2	Observaciones para el segundo experimento de superficie de respuesta.	29
3	Condiciones de cultivo en el bio-reactor.	31
4	Componentes del medio de cultivo.	32
5	Tratamientos usados durante el ensayo de invernadero.	35
6	Orden de los tratamientos en bloques completamente al azar.	36
7	CL50 de cada cepa calculada en ng/cm <sup>2</sup> a través de análisis Probit.	41
8	Factores y variables de respuesta para el primer mapeo de superficie de respuesta.	45
9	ANOVA del modelo lineal para el primer mapeo (células).	46
10	Valores de R <sup>2</sup> del modelo lineal para el primer mapeo (células).	47
11	ANOVA del modelo lineal para el primer mapeo (Cry).	48
12	Valores de R <sup>2</sup> del modelo lineal para el primer mapeo (Cry).	49
13	ANOVA del modelo cuadrático para el primer mapeo (células).	50
14	Valores de R <sup>2</sup> del modelo cuadrático para el primer mapeo (células).	51
15	ANOVA del modelo cuadrático para el primer mapeo (Cry).	52
16	Valores de R <sup>2</sup> del modelo cuadrático para el primer mapeo (Cry).	53
17	Factores y variables de respuesta para el segundo mapeo de superficie de respuesta.	62
18	ANOVA del modelo cuadrático para los 11 puntos muestrales (células).	63

19	Valores de R2 del modelo cuadrático para los 11 puntos muestrales (células).	64
20	ANOVA del modelo cuadrático para los 11 puntos muestrales (Cry).	65
21	Valores de R2 del mapeo de superficie de respuesta (Cry).	66
22	Diferencia de medias de los tratamientos en invernadero.	78

## I. RESUMEN

El complejo de gusanos barrenadores de la caña es un grupo de insectos lepidópteros que representan la principal plaga que afecta a los cultivos de caña de azúcar. En el estado de Sinaloa *Diatraea considerata* es la especie más abundante y la que provoca un mayor impacto sobre los cultivos. El uso de agrobiológicos representa una buena alternativa para sustituir a los pesticidas convencionales, siendo las bacterias de la especie *Bacillus thuringiensis* los agentes microbianos más utilizados.

Debido a que es necesario evaluar alternativas para el control de *D. considerata*, en el presente trabajo de investigación se caracterizaron morfológica y molecularmente 8 cepas regionales de *B. thuringiensis* aisladas de insectos lepidópteros, evaluándose su actividad entomopatógena contra larvas de *D. considerata* por medio de bioensayos, así como pruebas de invernadero. Se realizó a su vez un análisis para la optimización del medio utilizado para cultivar a la cepa que se seleccionó.

Se logró hacer aislamiento de las cepas de Bt y su caracterización, corroborándose que se trataba de aislados diferentes. Al realizar bioensayos sobre *Diatraea considerata* usando como controles las cepas de referencia Bt HD73 y HD1 se encontró que uno de los aislados regionales tenía efecto entomopatógeno sobre ellas, obteniéndose una  $CL_{50}$  de 3.189 ng/cm<sup>2</sup> de proteína, mucho menor a la de las cepas HD1 y HD73 (1711.473 y 234.52, respectivamente). Al seleccionarse la cepa y hacer los mapeos de superficie de respuesta se encontró que los valores centrales son los óptimos para la producción de Cry. Los monitoreos de las pruebas de invernadero arrojaron resultados con desviaciones estándar altas, por lo que sólo se obtuvo una diferencia del control positivo químico (lambda-cihalotrina), y las dosis alta y baja de la cepa regional con respecto al grupo control.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*; caña de azúcar; *Diatraea considerata*.

## ABSTRACT

The sugarcane borer complex is a group of lepidopteran insects that represent the main plague that affects the sugarcane crops. In the state of Sinaloa *Diatraea considerata* is the most abundant specie and the one that has a greater impact on the crops. The use of agrobiological agents represents a good alternative to substitute the conventional pesticides, being the bacteria of the *Bacillus thuringiensis* species the most used microbial agents.

Due to the need of alternatives for the control of *D. considerata*, in the present research work 8 *B. thuringiensis* autochthonous strains isolated from lepidopteran insects were characterized by morphology and molecular analysis, evaluating their entomopathogenic activity against *D. considerata* larvae as well, using bioassays and performing field tests. We also performed an analysis for the optimization of the culture medium used for the strain we selected.

We achieved the isolation of the Bt strains and their characterization, corroborating that they were different isolates. During the realization of the bioassays with *Diatraea considerata* using the reference strains Bt HD73 and HD1 as controls, we found that one of the autochthonous isolates had an entomopathogenous effect over the larvae, showing a LC<sub>50</sub> of 3.189 ng/cm<sup>2</sup> of protein, much less than the strains HD1 and HD73 (1711.473 and 234.52, respectively). Once the strain was selected and we did the response-surface evaluations we found that the central points are the optimal conditions for the autochthonous strain. The monitoring during the greenhouse experiments showed results with a high standard deviation, so that only the chemical control (lambda-cyhalothrin) and the high and low dose of the local strain had a significant difference compared to the control group.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; sugarcane; *Diatraea considerata*.

## II. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea perenne que se cultiva en climas tropicales, y que se caracteriza principalmente por su capacidad para almacenar altas concentraciones de sacarosa en los entrenudos del tronco. Se trata de un cultivo con gran potencial, y que actualmente es muy utilizado para la producción de edulcorantes y etanol.

En México, la agroindustria de la caña de azúcar es una actividad de alto impacto social y económico por las fuentes de empleo que genera en la industria y en el campo mexicano. La industria azucarera se ha desarrollado de forma ininterrumpida desde la década inicial de la conquista española, siendo una de las actividades agroindustriales de mayor tradición y trascendencia en el desarrollo histórico del país. En el estado de Sinaloa, se registró una producción de 141,441 toneladas de azúcar en el ciclo 2012/2013, teniéndose un rendimiento de 6.53 toneladas de azúcar por hectárea cultivada.

A nivel de campo, una de las principales problemáticas que enfrentan los agricultores del sector cañero son las plagas. Entre los insectos plaga de los que se tiene registro en cultivos de caña, es el complejo de gusanos barrenadores de la caña los de mayor importancia. En el estado de Sinaloa, este complejo está compuesto por tres especies, que son *Diatraea grandiosella*, *Eoreuma loftini* y *Diatraea considerata*, siendo esta última la que causa un mayor impacto sobre los cultivos.

El uso de agroquímicos ha sido por mucho tiempo el método predilecto para el control de plagas, sin embargo en los últimos años ha cobrado gran importancia la producción agrícola sustentable. Debido a lo anterior se buscan alternativas más ecológicas para solucionar las problemáticas presentadas en el campo, como propone el Manejo Integrado de Plagas, el cual es un conjunto de estrategias que buscan mantener un equilibrio entre los intereses sociales, económicos y ambientales durante la actividad agrícola.

Una de las estrategias utilizadas dentro de este marco es el control biológico de plagas, el cual podría definirse como el uso de depredadores, parasitoides y agentes microbiales para el control de insectos plaga. Entre los microorganismos que componen al grupo de agentes entomopatógenos el más utilizado a lo largo de la historia ha sido *Bacillus thuringiensis*, el cual es una bacteria Gram positiva formadora de esporas, que se caracteriza principalmente por la producción de inclusiones paraesporales compuestas de proteínas, las cuales suelen ser tóxicas para algunos órdenes de insectos. Estas toxinas son conocidas como proteínas Cry y son el principal componente de muchos agrobiológicos usados en la actualidad.

Las toxinas Cry actúan a nivel intestinal en los insectos blanco, siendo activadas por proteasas e interactuando con receptores presentes en el epitelio intestinal, dando lugar a la formación de poros y desequilibrio osmótico, provocando la muerte del insecto. La susceptibilidad a la acción de cada una de las toxinas es diferente para cada especie, ya que ésta dependerá directamente de la interacción que sus enzimas y receptores tengan con las proteínas.

A pesar de que hay una gran variedad de publicaciones relacionadas con *Bacillus thuringiensis* y sus proteínas Cry, pocas son las relacionadas a su interacción con *Diatraea considerata*, por lo que en nuestro estudio se evaluó la posibilidad de controlarla con una cepa regional.

### **III. REVISIÓN DE LA LITERATURA**

#### **A. Cultivo de caña**

La caña de azúcar es una gramínea tropical perenne con tallos gruesos y fibrosos que pueden crecer entre 3 y 5 metros de altura. Éstos contienen una gran cantidad de sacarosa que se procesa para la obtención de azúcar. La caña de azúcar es uno de los cultivos agroindustriales más importantes en las regiones tropicales. Se adapta a casi cualquier tipo de suelo, pero se desarrolla mejor en suelos francos, profundos y bien drenados. Se prefieren suelos con un pH de 7, pero se puede cultivar en un rango de 5.5 a 7.8 (SNV, 2008).

#### **1. Sector cañero en México**

En nuestro país, la agroindustria de la caña de azúcar es una de las más importantes debido a su relevancia económica y social en el campo mexicano. Esta agroindustria genera más de 440 mil empleos directos y beneficios indirectos a más de 2.2 millones de personas. Sus actividades productivas se desarrollan en 227 municipios de 15 entidades federativas, donde habitan 12 millones de personas.

En 2012, se obtuvo una producción de 5.1 millones de toneladas de azúcar, el valor generado en la producción de azúcar fue por 53.6 mil millones de pesos y el 57% se distribuyó entre los 164 mil productores de caña. Esta actividad representó el 4.7% del Producto Interno Bruto (PIB) del sector primario y el 2.3% del PIB manufacturero en ese año.

En lo referente a investigación y transferencia de tecnología, el país cuenta con investigadores dedicados en el cultivo de caña de azúcar, sin embargo es necesario reforzar la vinculación con el sector productivo para la atención de las demandas de investigación, así como la transferencia de tecnología e innovaciones tanto en campo como en fábrica que permita incrementar la productividad. Esto puede constituir la punta de lanza para

transformar y llevar a su máximo potencial productivo la agroindustria de la caña de azúcar (SEGOB, 2014).

## **2. Plagas de la caña de azúcar**

Todos los cultivos agrícolas se ven afectados en mayor o menor medida por diversas plagas, y la caña de azúcar no es la excepción. Las plagas de este cultivo pueden clasificarse en primarias y secundarias, siendo las primeras aquellas cuyas poblaciones alcanzan niveles que afectan de manera significativa la productividad, mientras que las secundarias están presentes durante el desarrollo del cultivo, pero generalmente sus niveles poblacionales no rebasan el umbral económico.

Las principales plagas primarias que afectan a los cultivos de caña de la región norte del estado son los gusanos barrenadores, el pulgón amarillo, la mosca pinta o “salivazo” y los gusanos defoliadores.

De las plagas anteriormente mencionadas es el gusano barrenador el que tiene un mayor impacto sobre el cultivo de caña. En el estado de Sinaloa se encuentran presentes tres especies, *D. considerata*, *D. grandiosella* y *Eoreuma loftini*, siendo la primera la más importante debido a su abundancia y la destrucción que genera (Vejar Cota, 2010).

### **B. *Diatraea considerata***

#### **1. Ciclo biológico**

Las hembras de *Diatraea* ponen sus huevecillos en masa o grupos, en el haz y en el envés de las hojas de caña de azúcar. Los huevecillos son color crema o blancuzco, circulares y aplanados, similares en apariencia a un grupo de escamas de pescado. Los huevecillos son lisos, ovalados y están sobrepuestos en pequeños grupos de 25 aproximadamente. Las larvas eclosionan de 4 a 9 días después de la oviposición, las cuales se desarrollan hasta alcanzar aproximadamente 2.5 cm de longitud.

Las larvas de esta especie presentan la cápsula cefálica y escudo cervical de color marrón claro, cuerpo de color blanco sucio que presentan



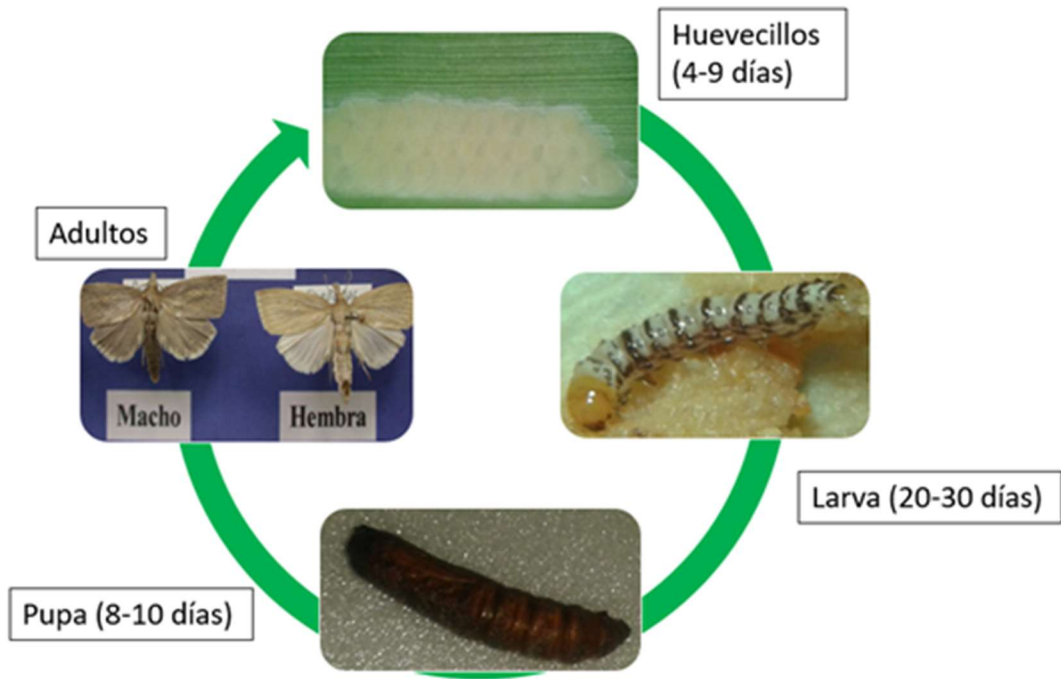
anillos de color púrpura del primero al octavo segmento abdominal, característica distintiva de esta especie. Las larvas pasan por 6 a 7 instares. El período como larva varía de 20 a 30 días, después de ese tiempo las larvas pupan.

Las pupas son de entre 1.8 y 2.0 cm aproximadamente y tienen numerosas proyecciones o “pelos” en el área abdominal. El adulto emerge después de aproximadamente 8 a 10 días de permanecer como pupa.

Con respecto a los adultos, la hembra es más clara que el macho, con tonalidades de color pajizo a grisáceo. Ambos sexos presentan líneas transversas (punteadas) diagonales en las alas anteriores. En condiciones de laboratorio se ha determinado que el ciclo de vida de este barrenador es de 43 días a condiciones de 28 °C. En campo el ciclo biológico es completado en un período que puede variar de 30 a 45 días durante el verano (Figura 1). Se producen de 4 a 5 generaciones al año (Álvarez & Pérez, 2004; Vejar Cota, 2011).

## **2. Distribución**

A nivel nacional este lepidóptero se encuentra en 5 de los 15 estados cañeros, que son Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima y Michoacán (Rodríguez del Bosque, 2009), como se ilustra en la **Figura 2**.



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Diatraea*. Modificado de Ortega Corona (1987).



**Figura 2.** Área de distribución de *D. considerata* en México. Modificada de Rodríguez del Bosque (2009).

## **C. *Bacillus thuringiensis***

### **1. Características generales**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es un bacilo Gram positivo, ubicuo y de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1.2  $\mu\text{m}$  de ancho y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar. Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y con actividad catalasa. Los distintos aislamientos de *B. thuringiensis* presentan en general características bioquímicas comunes: poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina (Sauka & Benintende, 2008). Su característica principal es la habilidad que posee para producir inclusiones cristalinas durante la esporulación. Estas inclusiones se componen de proteínas con una actividad insecticida altamente específica, lo que llevó a usarlo con el fin de formular productos para controlar plagas pertenecientes principalmente a los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera (Schnepf, Crickmore, Van Rie, Lereclus, Baum, Feitelson, et al., 1998).

La producción de dichas proteínas está codificada por los genes *cry*, los cuales, en su mayoría, son genes que se expresan durante la fase estacionaria de la cinética bacteriana, por lo que su expresión suele estar dependiente de la esporulación de la bacteria (Schnepf, et al., 1998).

*B. thuringiensis* puede encontrarse en diferentes ambientes, incluyendo suelo, cadáveres de insectos, polvo, hojas de plantas y ecosistemas acuáticos. Sus esporas pueden permanecer viables durante mucho tiempo, y el crecimiento vegetativo ocurre una vez que hay suficientes nutrientes disponibles (Cetinkaya, 2002).

### **2. Proteínas Cry**

Las toxinas Cry o  $\delta$ -endotoxinas secretadas por *B. thuringiensis* son aplicadas para el control de plagas agrícolas y de vectores de enfermedades

debido a su actividad insecticida. Desde la década de 1990 la nomenclatura de las toxinas Cry se ha basado en la identidad de su secuencia aminoacídica. Las toxinas que comparten menos del 45% de identidad en su secuencia primaria son identificadas por diferentes números arábigos en sus nombres. Cuando las toxinas Cry muestran una identidad de secuencia aminoacídica entre 45% y 70%, se incluye una letra mayúscula después del número. Además, si la similitud de secuencias entre las toxinas Cry está entre 70% y 95%, se adiciona una letra minúscula al nombre (Lucena, Pelegrini, Martins-de-Sa, Fonseca, Gomes, de Macedo, et al., 2014). Estas proteínas también pueden ser clasificadas de acuerdo a su especificidad contra ciertos órdenes de insectos, como se mencionará más adelante.

Las proteínas Cry han sido divididas en cuatro grandes grupos, que son las toxinas Cry de tres dominios (3D), la familia de las toxinas Cry mosquitocidas (Mtx), la familia de toxinas tipo binarias (Bin) y la familia de toxinas Cyt. Algunas cepas de Bt producen adicionalmente toxinas VIP durante su crecimiento vegetativo, sin embargo estas proteínas no forman cristales paraesporales, por lo que no son consideradas proteínas Cry.

De las cuatro grandes familias de proteínas Cry, la más grande es la 3D, contando con más de 50 grupos de toxinas. Al menos siete de las proteínas Cry 3D han sido cristalizadas y se conoce su estructura tridimensional, que son Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea (Bravo, Gómez, Porta, García-Gómez, Rodríguez-Almazan, Pardo, et al., 2012).

El Dominio I de estas toxinas está compuesto por un cúmulo de siete  $\alpha$ -hélices que está sometido a escisión proteolítica durante la activación de la toxina, lo cual podría ser responsable de la inserción en la membrana y formación del poro. El Dominio II consisten en tres hojas  $\beta$  antiparalelas, y juega un papel importante en las interacciones toxina-receptor. Finalmente, el Dominio III, que es escindido proteolíticamente en algunas proteínas Cry 3D, es un sándwich de dos hojas  $\beta$  antiparalelas que está también

involucrado en la unión a receptores y formación del poro (Palma, Muñoz, Berry, Murillo, & Caballero, 2014).

#### **a) Mecanismo de acción de las proteínas Cry**

Durante los últimos años el mecanismo de acción de las proteínas Cry ha sido objeto de estudio de diversas investigaciones. Basados en los descubrimientos que se han hecho, se han propuesto dos modelos de acción principales: el modelo de formación de poro y el modelo de vía de señalización.

El modelo de formación de poro de las toxinas Cry de tres dominios fue propuesto con base en la interacción de Cry1Ab con las vesículas de microvellosidades de epitelio intestinal de *Manduca sexta*, y consiste de varias etapas. Las inclusiones cristalinas son digeridas por larvas susceptibles en un ambiente intestinal alcalino, donde las proteínas inactivas solubilizadas son escindidas por proteasas en el extremo amino o carboxilo terminal para convertirse en un monómero de tres dominios. La toxina activa se une a múltiples receptores específicos localizados en la superficie de la membrana intestinal. En especies de lepidópteros como *M. sexta*, al menos dos tipos de receptores específicos están involucrados en la unión, que son fosfatasa alcalina (ALP) y aminopeptidasa N (APN), que promueven la concentración y localización de estas toxinas en el intestino. Una vez que reaccionan con cadherina se escinde la proteína y se forma un oligómero prepore. Finalmente interacciones entre los oligómeros y APN y ALP verás que las enzimas inducirán la inserción del oligómero y su inserción en la membrana, provocando la lisis de la célula.

Por otro lado, el modelo de señalización intracelular propone que la citotoxicidad está mediada por unión específica a receptores de cadherina, lo cual activa una cascada de señalización dependiente de  $Mg^{2+}$  que conduce a la muerte celular. Esta unión específica a cadherina podría estimular proteínas G y a la adenil ciclasa (AC), aumentando la concentración de AMPc y activando a la proteína cinasa A (PKA), teniendo como resultado una

desestabilización del citoesqueleto y canales iónicos en la membrana (Xu, Wang, Yu, & Sun, 2014).

### **b) Especificidad**

Actualmente se tienen registro de más de 73 grupos de proteínas Cry, teniendo efecto sobre organismos muy diversos, principalmente insectos, como se muestra en la Figura 3.

### **3. Uso de Bt a nivel mundial**

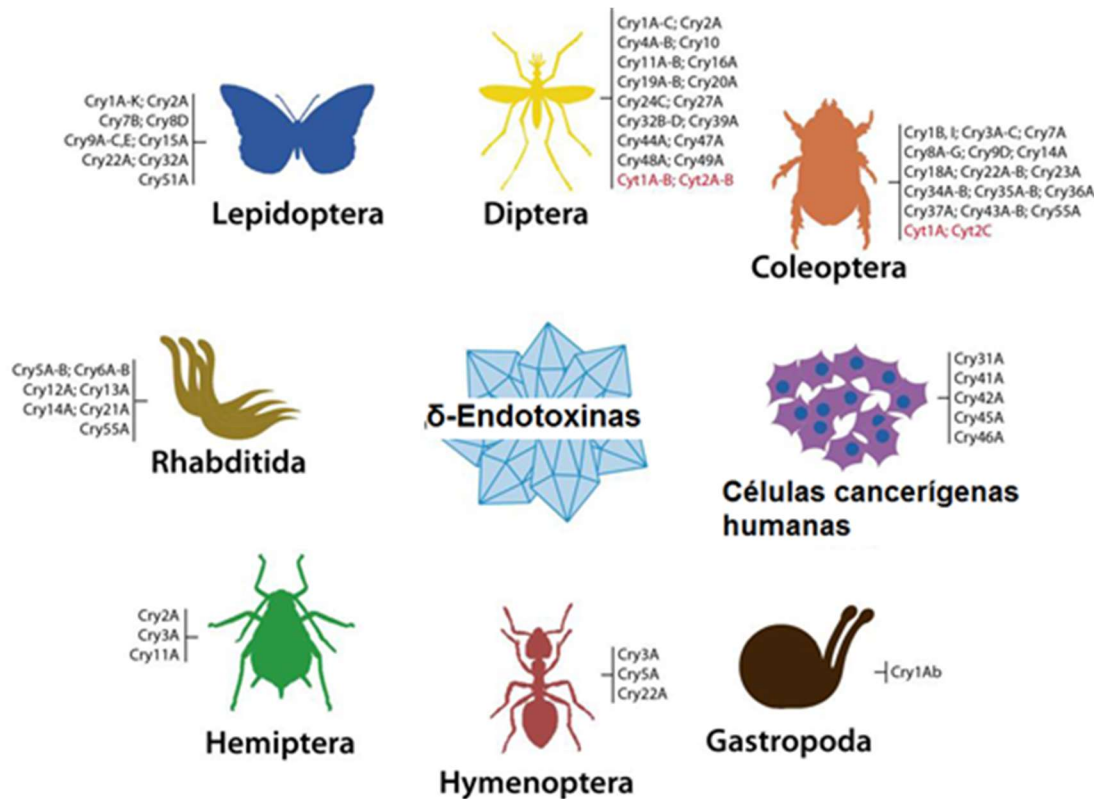
A pesar de la importancia y la viabilidad del uso de agentes microbiales para el control de plagas, sólo 2 % de los insecticidas usados alrededor del mundo están basados en la aplicación de biopesticidas, dentro de los cuales *Bt* representa aproximadamente el 95 % de los microorganismos usados. Por más de 50 años, *Bt* ha sido usado en formulaciones para el control biológico de muchas plagas agrícolas y vectores de enfermedades humanas.

Desde que el primer producto salió a la venta en Francia en 1938, más de 100 formulaciones fueron colocadas en el mercado mundial, siendo el continente americano responsable del 50 % de este mercado. De esta fracción, Estados Unidos y Canadá representan el 90 %, mientras que los países de América Latina tienen sólo 8-10 % del consumo, el cual está concentrado principalmente en Cuba y México, para el control de plagas en cultivos de algodón, plátano, papa, cítricos, vegetales, tabaco, maíz y pastura.

Existen muchos productos comerciales de *Bt* desarrollados para el control de plagas agrícolas de insectos así como especies de mosquito. La mayoría de las formulaciones espora-cristal son obtenidas de diferentes cepas. Éstas incluyen a *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*)-aislado HD1 (contiene las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa); *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*)-aislado HD73 (contiene Cry1Ac); *B. thuringiensis* var. *aizawai*-aislado HD137 (contiene Cry1Aa, Cry1B, Cry1Ca, y Cry1Da); *B. thuringiensis* var. San Diego and *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, (la cual contiene Cry3Aa); *B.*

*thuringiensis* var. *israelensis* (la cual contiene las toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1Aa) (Schünemann, Knaak, & Fiuza, 2014).





**Figura 3.** Resumen del espectro de organismos blanco de las toxinas de Bt. Cry1A-C indica un grupo de toxinas Cry1A, Cry1B y Cry1C. Cry1B, I indica diferentes toxinas Cry1B y Cry1I. Las toxinas Cyt se indican en rojo. Modificada de Palma, Muñoz, Berry, Murillo, and Caballero (2014).

En los últimos años el uso de *B. thuringiensis* se ha extendido más allá del ámbito agrícola. Se ha reportado, por ejemplo, que puede ser utilizado como antihelmíntico en sistemas de producción acuícola (**Mendoza Estrada, Hernández Velázquez, Arenas Sosa, Flores Pérez, Morales-Montor, & Peña Chora, 2016**), y que incluso algunas de sus proteínas, tales como paraesporinas, han mostrado tener efectos citotóxicos sobre células cancerígenas humanas (Lenina, Naveenkumar, Sozhavendan, Balakrishnan, Balasubramani, & Udayasuriyan, 2014; SY Wong, Mohamed, D Nadarajah, & Tengku, 2010).

#### **D. Antecedentes**

Los métodos para la evaluación de la efectividad de *B. thuringiensis* han ido evolucionando. Uno de los primeros trabajos publicados acerca de la interacción del género *Diatraea* con *B. thuringiensis* es el de Sikorowski and Davis (1970), en el cual se trabajó específicamente con *D. grandiosella*, (una especie altamente emparentada con *D. considerata*) el cual se ha reportado como plaga de maíz y caña, principalmente. Se utilizaron 3 metodologías diferentes para la inoculación del patógeno: Inmersión de trozos de tallo de maíz en soluciones con concentración conocida de esporas/mL de una cepa de *B. thuringiensis*; colocación directa de la solución sobre las rodajas, e inyección del tratamiento en las rodajas de maíz. Las dosis usadas estuvieron en el rango de  $1.25 \times 10^7$  –  $1.25 \times 10^8$  esporas/mL. El segundo y tercer método confirmaron los resultados obtenidos con el primero de ellos, encontrándose que una dosis de  $1.25 \times 10^8$  esporas/mL fue suficiente para causar mortalidades de alrededor del 80 % en larvas de 5 días de edad y del 75 % en larvas de 10 días de edad. Se pudo concluir que *D. grandiosella* es susceptible a *B. thuringiensis*, y que la muerte usualmente ocurre de 1-3 días post-inoculación.

En 2002 un grupo de investigación determinó la susceptibilidad a la proteína Cry1Ab (producida por *B. thuringiensis*) de poblaciones campo y de laboratorio de *D. grandiosella*. Los bioensayos se realizaron incorporando

una solución de Cry1Ab en la elaboración de la dieta artificial. La mortalidad larval se fue observada 7 y 14 días después de la aplicación del tratamiento. Como variables de respuesta se midieron los parámetros de mortalidad y de inhibición de crecimiento (representado por la inhibición de ganancia de peso), observándose en ambos casos que las poblaciones de campo eran más susceptibles a la acción de la toxina, teniendo la población más susceptible una CL<sub>50</sub> de 0.07 g Cry1Ac/g de dieta en el grupo que fue evaluado a los 7 días post-inoculación (Trisyono & Chippendale, 2002).

En 2005 se caracterizó una colección de cepas mexicanas de *B. thuringiensis* aisladas en el noroeste del país, que tuvieron actividad contra lepidópteros y coleópteros. Además, por medio de pruebas de inyección subcutánea de complejo espora-cristal en ratones Balb/c se determinó que las cepas son seguras para mamíferos, por lo que pueden ser usadas como plaguicidas sin ningún problema (Tamez, Iracheta, Pereyra, W., Gómez, G., et al., 2005).

Ramos, García, Domínguez, and Wong (2005) evaluaron distintas formulaciones a base de *B. thuringiensis* en campo para el control de *Diatraea sp.* Lograron concluir que el formulado asperjable a la dosis del 7%, en base a la cepa de *B. thuringiensis* aplicado en campo, es tan eficiente como un formulado comercial (Lepinox), y es altamente competitivo, ya que posee una dosis menor. Además, mencionan que el uso de formulados granulares no es recomendable para el cultivo de caña de azúcar.

Rosas García, Pereyra Alferez, Niño, Galín-Wong, and Morales Ramos (2004) probaron distintas cepas de *B. thuringiensis* contra *D. saccharalis*, y realizaron análisis proteínico y molecular para identificar a las toxinas que esas cepas producían. Lograron concluir que todas las cepas que resultaron tóxicas para esta especie de barrenador contenían en su genoma al menos un gen *cry1A*, los cuales suelen ser tóxicos para lepidópteros.

En 2008 se realizó un estudio en el cual fueron caracterizadas cepas de *B. thuringiensis* provenientes de Irán con alto potencial entomopatógeno

contra lepidópteros, encontrándose que cuatro de ellas fueron incluso más efectivas que *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (una cepa comercial ampliamente usada), a pesar de que mostraron perfiles proteicos y plasmídicos similares (Seifinejad, Jouzani, Hosseinzadeh, & Abdmishani, 2008).

En 2010 se realizó un estudio en el cual se evaluó el papel de las enzimas fosfatasa alcalina (ALP) y aminopeptidasa (APN) de las vesículas de las microvellosidades del epitelio intestinal (BBMV) en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* en larvas de *Manduca sexta*. Por medio de análisis proteínico de los extractos lograron observar que fosfatasa alcalina se expresa preferencialmente durante las primeras etapas del desarrollo larval, mientras que aminopeptidasa-N empieza a expresarse de manera importante después del 3er instar. Los investigadores determinaron que el nivel de expresión de dichas enzimas influyó sobre los resultados obtenidos a partir de los bioensayos con las toxinas Cry (Arenas, Soberón, & Gómez, 2010).

Fonseca G, Peña Chora, Trejo Loyo, Lina García, Rodríguez B, and Hernández Velázquez (2013) evaluaron la patogenicidad y virulencia de cepas de *B. thuringiensis* nativas del estado de Morelos contra *D. magnifactella*. Las cepas fueron aisladas a partir de cadáveres de *D. magnifactella*. De las 118 cepas obtenidas, durante los ensayos de patogenicidad 6 de ellas ocasionaron una mortalidad mayor al 50 % en larvas neonatas. Al determinarse la CL<sub>50</sub> de estas 6 cepas por el método de contaminación de superficie la que presentó mejores resultados fue la cepa B148 con CL<sub>50</sub> de 254.01 ng/cm<sup>2</sup> de dieta, menor a la de la cepa comercial HD1 417.61 ng/cm<sup>2</sup>, evaluada como testigo positivo. Las cinco cepas restantes presentaron CL<sub>50</sub> superiores a la de la cepa testigo. Al evaluar los perfiles proteicos de las cepas por SDS-PAGE, se encontró que al menos dos de las cepas más virulentas presentan como bandas mayoritarias proteínas de pesos de 60-65 kDa (reportadas usualmente como proteínas

Cry2) y de 140-150 kDa (generalmente correspondientes a proteínas Cry1). Los autores recalcan la importancia del uso de cepas nativas de cada región, por lo que en nuestro estudio se consideró importante abordar desde esta perspectiva el problema fitosanitario que representa *D. considerata*.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La agricultura juega un papel muy importante en la economía sinaloense, donde el cultivo de caña de azúcar tiene un gran potencial como fuente de empleos directos e indirectos debido a la posibilidad de diversificación de la agroindustria del azúcar, sin embargo, los daños causados por plagas llegan a ser hasta del 40% de la producción total. Por lo cual, es necesario buscar alternativas de control para la principal plaga que afecta a los cultivos de caña, *Diatraea considerata*. Dado el nivel de daño que puede provocar, y debido a la escasez de estudios que se tienen sobre esta especie, resulta relevante evaluar la eficacia de agentes de control biológico contra esta plaga. *B. thuringiensis* ha sido ampliamente utilizado para el control de plagas a nivel mundial y existen una gran cantidad de productos comerciales en el mercado. Sin embargo, se ha demostrado que las condiciones climáticas influyen sobre el efecto entomopatógeno de la bacteria, por lo que resulta idóneo contar con aislados regionales altamente efectivos para el control de *D. considerata*.

## V. HIPÓTESIS

Los aislados regionales de *Bacillus thuringiensis* representan una alternativa eficiente para el control de *Diatraea considerata*.

## VI. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Elaborar un formulado a base de una cepa regional de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Diatraea considerata*.

### B. Objetivos específicos

1. Aislar 8 cepas de *B. thuringiensis* de cadáveres de insectos colectados en campo.
2. Caracterizar molecularmente a las cepas.
3. Evaluar el efecto entomopatógeno de las cepas en larvas de *D. considerata*.
4. Probar en invernadero la efectividad del formulado elaborado con la cepa seleccionada.



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Diseño experimental

El estudio que se realizó tuvo un diseño experimental, longitudinal y prospectivo.

### B. Materiales

#### 1. Cepas de *Bacillus thuringiensis*

Los aislados de *B. thuringiensis* fueron obtenidos a partir de larvas muertas de insectos lepidópteros recolectadas de campos agrícolas de gramíneas.

Las larvas fueron maceradas en NaCl 0.85% estéril y sometidas a choque térmico. Posteriormente se tomó una asada del macerado y se sembró en agar nutritivo por estría cruzada, para la obtención de colonias únicas. Se seleccionaron aquellos aislados que presentaban un aspecto opaco, bordes irregulares y coloración crema; características típicas de un cultivo de *B. thuringiensis* (Cetlinkaya, 2002). Adicionalmente, se realizó tinción Gram y de endoesporas (Schaeffer & Fulton, 1933), para la visualización de los cristales de Cry.

#### 2. Larvas de *Diatraea considerata*

Las larvas que fueron utilizadas en el presente estudio provenían de una colonia criada en condiciones constantes de temperatura y ciclos de luz/obscuridad, establecida en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Molecular de la FCQB, UAS.

#### 3. Plantas de caña

Para las pruebas de invernadero se emplearon plantas de caña de azúcar variedad COLMEX-498, las cuales fueron donadas por la Universidad Tecnológica de Culiacán y en cuyas instalaciones se llevaron a cabo los ensayos.

## C. Métodos

### 1. Análisis molecular

#### a) Extracción de ADN

Las bacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo a 37 °C durante 24 h con agitación constante (200 rpm). Posteriormente se tomaron 1.5 mL del cultivo y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso 2 veces. La pastilla fue resuspendida en 400 µL de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 8; EDTA 10 mM, pH 8; SDS 1%; LiCl 100 mM) a 80 °C y 400 µL de cloroformo. La mezcla se incubó a 80 °C durante 1 minuto y se homogenizó con vortex. Se procedió a centrifugar a 13,000 rpm por 10 min y se tomó la fase superior acuosa, la cual fue trasvasada a otro tubo y se mezcló con un volumen igual de LiCl 4 M. Las muestras fueron incubadas a 4 °C durante toda la noche y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante fue recuperado y mezclado con un volumen igual de isopropanol para precipitar el ADN. Posteriormente se realizó otra centrifugación y la pastilla fue lavada 2-3 veces con etanol 70%. La pastilla se dejó secar y se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril. Modificado de Ritchie and Raina (2016).

La integridad del ADN fue visualizada en geles de agarosa al 1.5%. La cuantificación y la determinación de pureza se llevaron a cabo por medio de espectrofotometría en el equipo NanoDrop (Thermo Scientific); se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm de la muestra. Los datos obtenidos fueron sustituidos en la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración}^{\text{ng}}/\mu\text{L} = (\text{Abs}_{260})(fc) \quad (1)$$

Donde:

fc =factor de conversión de DNA de doble cadena equivalente a 50 ng/µL.La pureza del material genético fue determinada de la siguiente manera:

$$\text{Pureza} = \text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280} \quad (2)$$

## **b) Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)**

La identificación molecular y relación filogenética entre los aislados bacterianos fueron determinados mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA, lo cual se realizó a través de la empresa Macrogen Inc (Korea).

Las secuencias nucleotídicas fueron comparadas con las registradas en el GenBank para *B. thuringiensis* y el alineamiento de secuencias y análisis filogenético (Neighbor Joining) se realizó con la ayuda del software CLC Sequence Viewer.

A la par, se realizó el mismo procedimiento con la cepa de referencia Bt HD73 subsp. Kurstaki.

## **c) Identificación de las proteínas Cry**

Para la obtención de los cristales paraesporales las cepas fueron cultivadas en medio para esporulación HCT (Buenosaires Álvarez, 2014) durante 72-96 h, o hasta observar la lisis de todos los esporangios. Los cultivos fueron centrifugados a 5,000 rpm, y las pastillas fueron solubilizadas en amortiguador de carbonatos ( $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$  50 mM, EDTA 50 mM, pH 10), bajo agitación suave, a 37 °C por 2 h. Una vez terminada la solubilización las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford, utilizando como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) (Bradford, 1976).

Para realizar la identificación de las proteínas se realizó SDS-PAGE, en geles con 5-10% de las fases concentradora y separadora, respectivamente. Posteriormente se realizó Western blot, para lo cual se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó con PBS 1X – leche descremada 1%, y se añadió un anticuerpo policlonal de conejo anti-Cry1Ab (Abcam) en una dilución 1:2000. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-RbIgG de cabra acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:2000, y para el revelado se utilizó 4-cloronaftol y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Una vez que se identificaron las bandas positivas para Cry1Ab, éstas fueron procesadas para su posterior identificación por espectrometría de masas.

Para la extracción y lavado de las bandas los geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie que contenían las bandas de interés fueron lavados 2 veces con agua destilada durante 10 min. Posteriormente con la ayuda de un cortador de spots (EXQuest, Bio-Rad) se extrajeron piezas de 1 mm<sup>2</sup> de cada banda, las cuales fueron colocadas en placas de 96 pozos. Las partículas de gel fueron lavadas NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM/Acetonitrilo (1:1) por 15 min. Posteriormente se removió el remanente y se adicionaron 50 µL de acetonitrilo (ACN) por 5 min. Una vez que se removió el ACN se rehidrató el gel con 25 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM. Transcurridos 5 min se adicionaron 25 µL de ACN, y luego de 15 min se removió todo el líquido. Se volvió a hacer un lavado de 5 min con ACN, y una vez retirado el remanente las partículas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para la reducción y alquilación se adicionaron 2 µL de Ditioneitol (DTT) 1000 mM y 200 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, dejándose incubar por 45 min a 56 °C. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se retiró el remanente. Posteriormente se agregaron 200 µL de iodoacetamida 55 mM y se incubaron 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez retirado el sobrenadante las muestras se lavaron 2 veces por 15 min con NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM/Acetonitrilo (1:1), y por último se adicionaron 50 µL de ACN por 5 min, se quitó el remanente y se dejó secar a temperatura ambiente.

Para la digestión de las proteínas en gel se adicionó tripsina de cerdo en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM en una concentración de 25 ng/µL, y se dejó incubar a 37 °C durante toda la noche. Se removió el exceso de enzima, se incubó 12 h en 50 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a 37 °C y se guardó en congelación el sobrenadante.

Los péptidos fueron extraídos de la partícula de gel agregando 50  $\mu$ L de ácido trifluoroacético al 0.1 % y 50  $\mu$ L de ACN. Se dejó incubando 30 min a temperatura ambiente, agitando cada 5 min. El sobrenadante se guardó en congelación hasta su posterior análisis. Todos los sobrenadantes fueron descongelados y mezclados, y posteriormente se evaporó el solvente con la ayuda de una centrifuga de vacío.

Los péptidos fueron resuspendidos en ácido trifluoroacético, y se realizó MALDI-TOF (MS/MS) en un espectrómetro de masas UltraFlex extreme (Bruker, USA) con fragmentación LIFT. Se utilizó una placa AchorChip y una matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), siguiendo el protocolo de gota seca sugerido por el fabricante. La intensidad del láser fue ajustada a 50% para la adquisición de las masas parentales y 60-60% para las masas fragmentadas, con tres o cuatro repeticiones. Para el análisis se consideraron espectros con picos de  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^4$  de intensidad. La identidad de la proteína fue comparada usando la base de datos de eubacteria de Swiss-Prot, y los criterios de MASCOT con enzima tripsina, cortes perdidos: 1, modificación fijada: carbamidometil C, modificación de variable: oxidación M, tolerancia de parentales: 0.2 Da, tolerancia de fragmentos: 0.5 Da. Las identificaciones proteicas positivas fueron aquellas que arrojaron un puntaje de MASCOT más alto de 30. Como controles positivos se usaron las toxinas de las cepas de referencia Bt kurstaki HD73 y HD1.

## **2. Bioensayos**

Las proteínas de los complejos espóra-cristal fueron obtenidos de las cepas de estudio de la siguiente forma: Se crecieron las cepas en agar nutritivo a 30 °C durante 96 h o hasta obtener  $\geq 90$  % de esporulación. El cultivo se recuperó con un raspador de células y fue suspendido en solución salina estéril. El contenido proteico de la solución madre fue cuantificado por

el método de Bradford, lo que se tomó como base para preparar las dosis de los bioensayos en diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ).

Los bioensayos fueron realizados con larvas de *D. considerata* de 1<sup>er</sup> instar, por el método de inoculación de superficie de la dieta (Hernandez-Rodriguez, Hernandez-Martinez, Van Rie, Escriche, & Ferre, 2013). Las proteínas fueron dosificadas sobre la dieta en un volumen de 30  $\mu$ L por cada pocillo (2  $\text{cm}^2$ ); se dejó secar la dieta y posteriormente se colocaron las larvas. Se incluyeron 24 larvas por tratamiento y como control negativo se usó agua destilada estéril. Los resultados fueron monitoreados 4 días después de la inoculación. Para cada proteína se determinó una  $\text{CL}_{50}$  (en  $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) por análisis Probit (Arenas, Soberón, & Gómez, 2010; Luo, Banks, & Adang, 1999) con la ayuda del software IBM SPSS v18.0.

Los resultados fueron comparados con los niveles de mortalidad y la  $\text{CL}_{50}$  que se obtuvo con la cepa de referencia HD73. Una vez concluido cada bioensayo se realsó a las bacterias de las larvas muertas por el método anteriormente descrito, con el fin de comprobar que se cumplan los postulados de Koch (Koch, 1982).

### **3. Superficie de respuesta**

Para la optimización del medio de cultivo de harina de soya que se empleó para la producción masiva de *B. thuringiensis*, se siguió la metodología de superficie de respuesta, para la cual se tuvieron como factores: la concentración de glucosa (fuente de carbono) y de harina de soya (fuente de nitrógeno), y como variables de respuesta: la concentración de esporas/mL, proteínas solubles (mg/mL) y toxina activa (65 kDa). Se utilizaron 3 réplicas del valor central, y un valor alto (+1) y bajo (-1) para cada factor. Se tomaron como valores centrales aquellos reportados en la literatura (Farrera, 1998). Los tratamientos usados se muestran en los Cuadro 1 y Cuadro 2.

**Cuadro 1.** Tratamientos usados en el primer ensayo de superficie de respuesta.

<b>Tratamiento</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Harina de soya</b>	<b>Nivel de glucosa</b>	<b>Nivel harina de soya</b>
<b>T1</b>	47	27.5	0	0
<b>T2</b>	57	32.5	+1	+1
<b>T3</b>	57	22.5	+1	-1
<b>T4</b>	37	22.5	-1	-1
<b>T5</b>	37	32.5	-1	+1
<b>T6</b>	47	27.5	0	0
<b>T7</b>	47	27.5	0	0

**Cuadro 2.** Observaciones para el segundo experimento de superficie de respuesta.

<b>Observación</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Harina de Soya (g/L)</b>
<b>Obs1</b>	37.000	22.500
<b>Obs2</b>	57.000	22.500
<b>Obs3</b>	37.000	32.500
<b>Obs4</b>	57.000	32.500
<b>Obs5</b>	32.858	27.500
<b>Obs6</b>	61.142	27.500
<b>Obs7</b>	47.000	20.429
<b>Obs8</b>	47.000	34.571
<b>Obs9</b>	47.000	27.500
<b>Obs10</b>	47.000	27.500
<b>Obs11</b>	47.000	27.500



#### **4. Pruebas de invernadero**

##### **a) Elaboración del formulado**

Se cultivó la cepa seleccionada en un bio-reactor Bioflo 3000 (New Brunswick), manteniendo constantes las condiciones de cultivo mostradas en el Cuadro 3. La bacteria se activó cultivándose primeramente en 200 mL de caldo nutritivo, a 30 °C y bajo agitación (200 rpm) durante 6-7 horas, o hasta que presente una  $Abs_{600}$  de 0.25-0.3. Una vez que el cultivo tenga una concentración bacteriana óptima se procederá a pasar una alícuota de 10 mL a un matraz con 200 mL del medio de cultivo que se usará en el bio-reactor, cuya composición (Farrera, 1998) se muestra en el Cuadro 4, y se cultivó bajo las mismas condiciones durante 12-14 horas, con el fin de que las bacterias tengan oportunidad de adaptarse al medio y puedan desarrollarse de manera óptima. Transcurrido el tiempo necesario se procedió a pasar el inóculo de 200 mL al bio-reactor, el cual ya contendrá 4 L de medio estéril, con pH y temperatura ajustados. La bacteria se dejó cultivando durante 96 h, y posteriormente se cosechó el medio para proceder a formularlo.

El cultivo cosechado se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y añadió la siguiente formulación para proceder a liofilizar: 1% de extracto de levadura, 10% de lactosa y 1.5% de Tween 80, con respecto a los sólidos insolubles en el medio (Farrera, 1998). La mezcla se pasó a un vaso de liofilizado y se dejará congelar a -20 °C durante dos días, para después dejarla liofilizándose durante 1 día, en un equipo Freezone (Labconco). El polvo seco se resuspendió en agua destilada y fue usado para las pruebas de invernadero.

**Cuadro 3.** Condiciones de cultivo en el bio-reactor.

<b>Parámetro</b>	<b>Valores</b>
<b>Temperatura</b>	28-30 °C
<b>pH</b>	7.4
<b>DO (oxígeno disuelto)</b>	≥20%
<b>Agitación</b>	500-800 rpm

**Cuadro 4.** Componentes del medio de cultivo.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Glucosa</b>	47 g
<b>Harina de soya</b>	27.5 g
<b>Extracto de levadura</b>	5.9 g
<b>Sulfato manganoso</b>	0.04 g
<b>Sulfato de magnesio heptahidratado</b>	0.2 g
<b>Sulfato de zinc heptahidratado</b>	0.0058 g
<b>Sulfato de cobre pentahidratado</b>	0.0075 g
<b>Cloruro de cobalto</b>	0.03 g
<b>Cloruro de potasio</b>	3 g
<b>Sulfato ferroso</b>	0.0135 g
<b>Ácido fosfórico 85%</b>	7 mL
<b>Antiespumante</b>	2 mL
<b>Hidróxido de sodio</b>	*El necesario para llevar a un pH de 7.4
<b>Agua destilada</b>	c.b.p. 1 L

## **b) Aplicación de los tratamientos**

Cada tratamiento estuvo constituido por 5 plantas de caña de azúcar, y se probaron 3 dosis del aislado seleccionado en función de la producción de proteína Cry correspondiente, realizando la inoculación por aspersion. Cada planta fue infestada de manera artificial con 1 larva neonata de *D. considerata*, colocándola cuidadosamente sobre el follaje, como se muestra en la Figura 4.

La infestación se realizó durante la mañana, para permitir que la larva se adaptara, mientras que la aplicación de los tratamientos se hizo al atardecer, a punto se obscurecer, lo cual permitió que los rayos UV no afectaran directamente la acción de los tratamientos.

Los resultados fueron monitoreados a un mes después de la aplicación, evaluando la cantidad de plantas dañadas por barrenador (corazón muerto, barrenos en el tallo) en cada uno de los tratamientos, comparándose con un control negativo (cañas infestadas, sin la aplicación de ningún tipo de biopesticida), un control químico (lambda-cihalotrina) y control biológico (cepa HD73), Cuadro 5. Las pruebas se distribuyeron por bloques completamente al azar (Cuadro 6).

## **5. Análisis estadístico**

Todos los experimentos fueron realizados mínimamente por duplicado. Se realizó ANOVA de un factor, tomándose como estadísticamente significativa una  $p \leq 0.05$ . Las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron determinadas con el método LSD.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos en las pruebas de laboratorio fueron corregidos con la fórmula de Abbot.



**Figura 4.** Infestación artificial con larvas de *Diatraea considerata*. A) Colocación de la larva con la ayuda de un pincel. B) Larva colocada sobre el follaje, señalada con una flecha roja.

**Cuadro 5.** Tratamientos usados durante el ensayo de invernadero.

<b>Rótulo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis</b>
<b>Tratamiento 1</b>	Testigo absoluto	Sin aplicación
<b>Tratamiento 2</b>	Lambda-cihalotrina	5 mL/L
<b>Tratamiento 3</b>	Bt HD73	5 g/L
<b>Tratamiento 4</b>	Bt D (1)	2.5 g/L
<b>Tratamiento 5</b>	Bt D (2)	5 g/L
<b>Tratamiento 6</b>	Bt D (3)	10 g/L

**Cuadro 6.** Orden de los tratamientos en bloques completamente al azar.

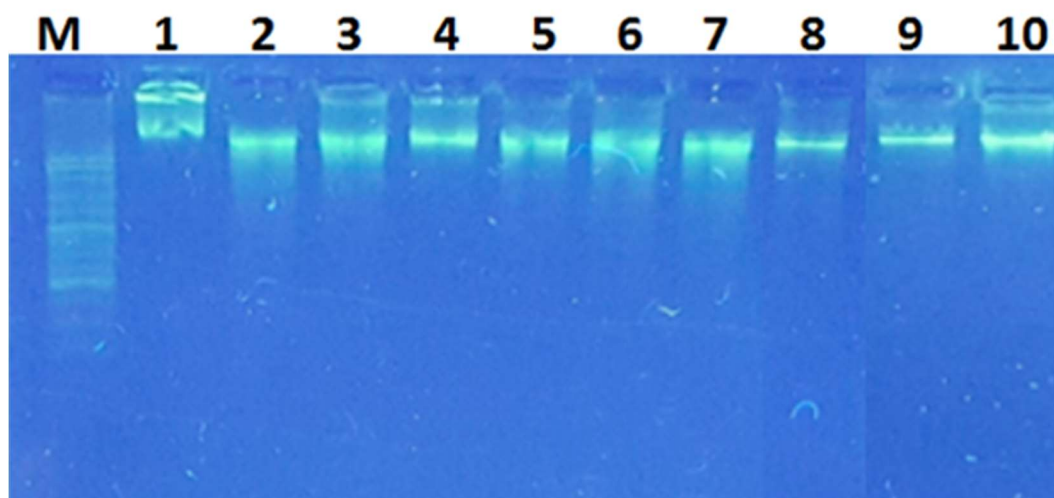
<b>Bloque 4</b>	<b>Bloque 3</b>	<b>Bloque 2</b>	<b>Bloque 1</b>
<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>6</b>

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

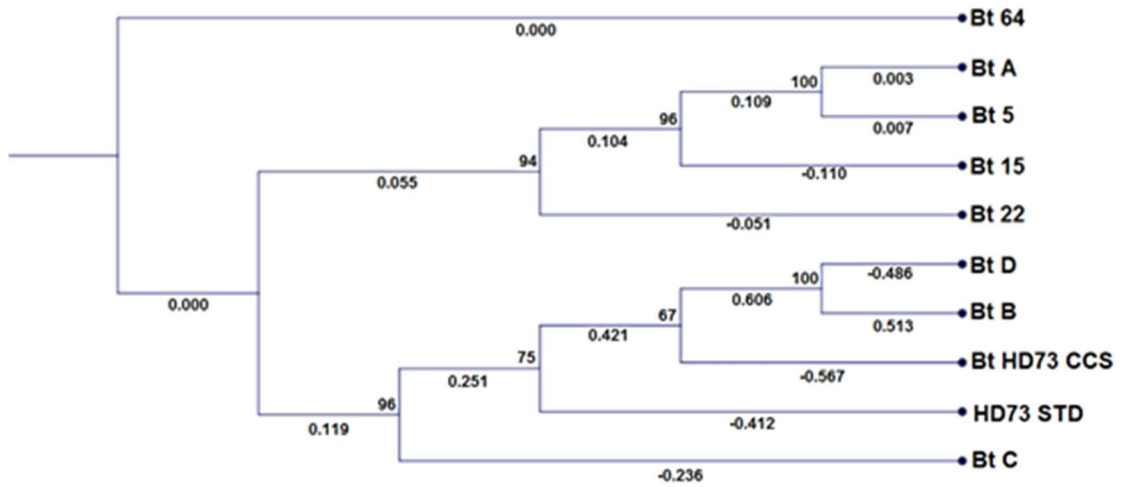
### A. Caracterización molecular de las cepas

Se logró extraer el ADN total genómico) de las bacterias mediante el protocolo anteriormente descrito, obteniéndose material íntegro, como se muestra en la Figura 5, el cual fue enviado a Macrogen Inc (Korea) para la obtención de la secuencia del amplicón del gen 16S rRNA. Una vez obtenidas las secuencias se realizó un BLAST en la base de datos de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para compararlas con las secuencias disponibles para *B. thuringiensis*, y comprobar que pertenecieran a esta especie. Se obtuvo además un árbol de Neighbour Joining (Figura 6) a través del alineamiento de las secuencias para observar similitud entre las cepas, observándose que efectivamente se trataba de aislados diferentes y que incluso tres de ellas (B, C y D) se encontraban cercanas a la cepa de referencia Bt HD73. Con respecto a las proteínas, se corroboró por medio del alineamiento con las secuencias almacenadas en SwissProt que las toxinas producidas por HD73 y HD1 eran Cry1Ac y Cry1Aa, respectivamente.





**Figura 5.** Integridad del material genético visualizado en un gel de agarosa al 1.5 %.



**Figura 6.** Árbol de Neightbor Joining obtenido con el alineamiento de las secuencias del gen rRNA 16S de cada una de las cepas.

Se muestran dos agrupaciones principales, en las que la cepa Bt64 fue la más lejana a todas las demás.

## **B. Efectividad de las cepas contra *D. considerata***

Una vez realizado un monitoreo preliminar a través de bioensayos se determinó que además de las cepas de referencia sólo una de las cepas regionales (cepa D) tuvo un efecto de mortalidad sobre las larvas de *D. considerata*. Dicha cepa fue utilizada para realizar bioensayos posteriores para calcular su CL<sub>50</sub> a través de análisis Probit, usando como comparativos las dos cepas de referencia (Bt HD1 y Bt HD73), encontrándose que la cepa regional tuvo una menor CL<sub>50</sub>, como se muestra en el Cuadro 7.

Cabe destacar que esta cepa arrojó incluso una dosis menor comparada con algunas utilizadas en otros estudios sobre plagas altamente emparentadas con *D. considerata*, como *D. saccharalis*, la cual fue confrontada con cepas de colección y autóctonas de Nuevo León, en un estudio publicado en 2004. A pesar de que en dicho estudio se utilizó una metodología diferente para medir la virulencia de las cepas (el complejo spora-cristal se mezcló con la dieta durante su elaboración), se utilizaron cantidades mucho mayores para obtener mortalidades del 50% sobre las larvas, ya que la CL<sub>50</sub> más baja que se obtuvo fue de 33.21 µg/mL (Rosas García, Pereyra Alferez, Niño, Galín-Wong, & Morales Ramos, 2004).

En el estudio realizado por Fonseca y col. en 2013 se utilizó la misma metodología sobre *D. magnifactella*, con cepas regionales del estado de Morelos, utilizando como referencia a Bt HD1. A pesar de que obtuvieron una CL<sub>50</sub> mayor la del presente estudio, se muestra una tendencia similar al haber mejor respuesta por parte de algunas cepas regionales que de las de referencia (Fonseca G, Peña Chora, Trejo Loyo, Lina García, Rodríguez B, & Hernández Velázquez, 2013). Lo anterior podría indicarnos que, como mencionan algunos autores, es probable que las toxinas de Bt coevolucionan con los insectos blanco (Arenas Sosa, 2010).

**Cuadro 7.** CL<sub>50</sub> de cada cepa calculada en ng/cm<sup>2</sup> a través de análisis Probit.

Cepa	Probabilidad (PROBIT)	Límites de confianza al 95 % para Dosis		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior
<b>BtD</b>	0.5	3.189	0.237	8.401
<b>HD1</b>	0.5	1711.473	159.237	1.153E7
<b>HD73</b>	0.5	234.52	-	-

### C. Optimización del medio de cultivo

En el cuadro Cuadro 8 se muestran las respuestas obtenidas para el primer mapeo con 7 puntos. Se probó primeramente un modelo lineal, cuyos ANOVAs y valores de  $R^2$  para cada respuesta se observan en los Cuadro 9, Cuadro 10, Cuadro 11 y Cuadro 12. Los gráficos de contorno y 3D para la variable 1 se muestran en las Figura 7 y Figura 8 respectivamente, mientras que los gráficos de la variable 2 se encuentran en las Figura 9 y Figura 10.

Las ecuaciones arrojadas por el modelo lineal para el primer mapeo son las siguientes:

$$\text{Células} = 1.324E^9 + 2.413E^8*A + 3.375E^7*B \quad (3)$$

$$\text{Cry} = 7.341 + 0.697*A + 0.657*B \quad (4)$$

Posteriormente se probó un modelo cuadrático, cuyos ANOVAs y valores de  $R^2$  para cada respuesta se observan en los Cuadro 13, Cuadro 14, Cuadro 15 y Cuadro 16. Los gráficos de contorno y 3D para la variable 1 se muestran en las Figura 11 y Figura 12 respectivamente, mientras que los gráficos de la variable 2 se encuentran en las Figura 13 y Figura 14.

Las ecuaciones arrojadas por el modelo cuadrático para el primer mapeo son las siguientes:

$$\text{Células} = 1.42E9 + 2.413E8*A + 3.375E7*B - 1.463E8*AB - 1.688E8*A^2 + 0*B^2 \quad (5)$$

$$\text{Cry} = 14.418 + 0.697*A + 0.657*B + 0.534*AB - 12.385*A^2 + 0*B^2 \quad (6)$$

Tanto en el modelo lineal como cuadrático que el valor central de ambas variables está cercano al óptimo para la proteína Cry, que es la variable de respuesta de mayor interés.

Debido a lo anterior se complementó el diseño central compuesto con cuatro puntos muestrales adicionales, tomándose un modelo cuadrático. En el Cuadro 17 se muestran las respuestas que se obtuvieron para cada una de las 11 condiciones. Las ecuaciones arrojadas por el modelo cuadrático para los 11 puntos muestrales fueron las siguientes:

$$\text{Células} = 1.422E^9 + 1.372E^8 * A + 3.835E^7 * B - 1.475E^8 * AB - 2.024E^8 * A^2 - 2.365E^7 * B^2 \quad (7)$$

$$\text{Cry} = +14.418 + 0.517 * A + 1.012 * B + 0.534 * AB - 6.953 * A^2 - 2.73 * B^2 \quad (8)$$

Los ANOVAs y valores de  $R^2$  para el segundo mapeo se muestran en los Cuadro 18, Cuadro 19, Cuadro 20 y Cuadro 21.

En los resultados del segundo mapeo se observó un comportamiento similar para la variable de respuesta Cry, por lo que el medio de cultivo puede considerarse óptimo para los valores centrales. En las Figura 15, Figura 16, Figura 17 y Figura 18 se muestran las gráficas de contorno y 3D para la variable 1, así como las de la variable 2.

En todos los tratamientos se corroboró la presencia de esporas y cristales por tinción Scheaffer-Fulton (Figura 19). Para la observación de proteína Cry se realizó SDS-PAGE del primer mapeo (Figura 20) así como su respectiva curva de BSA (Figura 21). De igual manera se obtuvo el perfil proteico de los 4 puntos adicionales del segundo mapeo (Figura 22) así como su respectiva cura estándar (Figura 23).

Los valores centrales fueron tomados del trabajo realizado por Farrera, y como se observó durante el primer mapeo y en el análisis molecular, la cepa regional es y se comporta de manera muy similar a Bt HD73 (Farrera, 1998).

En un estudio publicado en 1998 se probó el efecto de diferentes variables sobre la esporulación de una cepa de *B. thuringiensis*, encontrando

que el nivel óptimo de una de las fuentes de nitrógeno (harina de pescado) era casi de +1 (Liu & Tzeng, 1998). Sin embargo es importante considerar el hecho de que había cuatro variables en juego (en lugar de sólo 2) y que como respuesta sólo se tomó la cuenta total de esporas.

En otro trabajo publicado en 2006 se encontró que aumentando la relación C:N de 20:1 a 22:2 se aumentaba la producción tanto de Cry4Ba como de Cry11Aa, sin embargo no sólo se tomaron como variables carbono, nitrógeno y algunos iones, sino que además se jugó con la temperatura de incubación (Tokcaer, Bayraktar, Mehmetoğlu, Özcengiz, & Alaeddinoğlu, 2006).

En otro estudio publicado en 2011, al igual que en nuestro estudio, se tomaron en cuenta ambas variables de respuesta (producción de toxina y cuenta viable), encontrando que un ligero aumento (5.4 a 5.8 g/L) en la fuente de nitrógeno (extracto de levadura) mejoraba el rendimiento hasta en un 38 % (Saoussen Ben, Amel, Samir, & Nabil, 2011).

**Cuadro 8.** Factores y variables de respuesta para el primer mapeo de superficie de respuesta.

<b>No.</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A=Glucosa g/L</b>	<b>B=Harina de soya g/L</b>	<b>Cels/mL</b>	<b>Cry ug/mL</b>
4	-1	-1	37	22.5	8.30E+08	1.21
3	1	-1	57	22.5	1.61E+09	1.54
5	-1	1	37	32.5	1.19E+09	1.46
2	1	1	57	32.5	1.38E+09	3.92
1	0	0	47	27.5	2.08E+09	15.02
6	0	0	47	27.5	6.85E+08	18.59
7	0	0	47	27.5	1.50E+09	9.65



**Cuadro 9.** ANOVA del modelo lineal para el primer mapeo (células).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>df</b>	<b>Media de Cuadrados</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Prob &gt; F</b>	<b>Valor de p</b>
Modelo	2.374E+017	2	1.187E+017	0.43	0.6787	NS
<i>A-Glucosa</i>	2.328E+017	1	2.328E+017	0.84	0.4115	
<i>B-Harina de soya</i>	4.556E+015	1	4.556E+015	0.016	0.9042	
Residual	1.110E+018	4	2.775E+017			
<i>Falta de Ajuste</i>	1.344E+017	2	6.719E+016	0.14	0.8789	NS
<i>Error Puro</i>	9.757E+017	2	4.878E+017			
Cor Total	1.347E+018	6				

NS = No Significativo

**Cuadro 10.** Valores de R2 del modelo lineal para el primer mapeo (células).

Desv Std	5.268E+008	R-Cuadrado	0.1762
Media	1.324E+009	Adj R-Cuadrado	-0.2358
C.V. %	39.80	Pred R-Cuadrado	-0.6333
PRESS	2.201E+018	Precisión Adq	1.595
-2 Log Likelihood	297.10	BIC	302.94
		AICc	311.10

**Cuadro 11.** ANOVA del modelo lineal para el primer mapeo (Cry).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>df</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Valor F</b>	<b>Prob &gt; F</b>	<b>Valor de p</b>
Model	3.67	2	1.84	0.024	0.9763	NS
<i>A-Glucosa</i>	1.94	1	1.94	0.026	0.8808	
<i>B-Harina de soya</i>	1.73	1	1.73	0.023	0.8876	
Residual	304.60	4	76.15			
<i>Falta de Ajuste</i>	264.09	2	132.04	6.52	0.1330	NS
<i>Error Puro</i>	40.51	2	20.26			
Cor Total	308.28	6				

NS = No Significativo

**Cuadro 12.** Valores de R2 del modelo lineal para el primer mapeo (Cry).

Desv Std	8.73	R-Cuadrado	0.0119
Media	7.34	Adj R-Cuadrado	-0.4821
C.V. %	118.87	Pred R-Cuadrado	-2.7373
PRESS	1152.11	Precisión Adq	0.474
-2 Log Likelihood	46.28	BIC	52.11
		AICc	60.28

**Cuadro 13.** ANOVA del modelo cuadrático para el primer mapeo (células).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>df</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Valor F</b>	<b>Prob &gt; F</b>	<b>Valor de p</b>
Modelo	3.717E+017	4	9.293E+016	0.19	0.9239	NS
<i>A-Glucosa</i>	2.328E+017	1	2.328E+017	0.48	0.5611	
<i>B-Harina de soya</i>	4.556E+015	1	4.556E+015	9.340E-003	0.9318	
<i>AB</i>	8.556E+016	1	8.556E+016	0.18	0.7161	
<i>A<sup>2</sup></i>	4.882E+016	1	4.882E+016	0.10	0.7817	
<i>B<sup>2</sup></i>	0.000	0				
Error Puro	9.757E+017	2	4.878E+017			
Cor Total	1.347E+018	6				

NS = No Significativo

**Cuadro 14.** Valores de R2 del modelo cuadrático para el primer mapeo (células).

Dev. Std.	6.984E+008	R-Cuadrado	0.2759
Media	1.324E+009	Adj R-Cuadrado	-1.1723
C.V. %	52.77	Pred R-Cuadrado	N/A
PRESS	N/A	Precisión Adq.	1.313
-2 Log Likelihood	296.20	BIC	305.93
		AICc	366.20

**Cuadro 15.** ANOVA del modelo cuadrático para el primer mapeo (Cry).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>df</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Valor F</b>	<b>Prob &gt; F</b>	<b>Valor de p</b>
Modelo	267.76	4	66.94	3.30	0.2456	NS
<i>A-Glucosa</i>	<i>1.94</i>	<i>1</i>	<i>1.94</i>	<i>0.096</i>	<i>0.7860</i>	
<i>B-Harina de soya</i>	<i>1.73</i>	<i>1</i>	<i>1.73</i>	<i>0.085</i>	<i>0.7978</i>	
<i>AB</i>	<i>1.14</i>	<i>1</i>	<i>1.14</i>	<i>0.056</i>	<i>0.8345</i>	
<i>A<sup>2</sup></i>	<i>262.95</i>	<i>1</i>	<i>262.95</i>	<i>12.98</i>	<i>0.0691</i>	
<i>B<sup>2</sup></i>	<i>0.000</i>	<i>0</i>				
Error Puro	40.51	2	20.26			
Cor Total	308.28	6				

NS = No Significativo

**Cuadro 16.** Valores de R2 del modelo cuadrático para el primer mapeo (Cry).

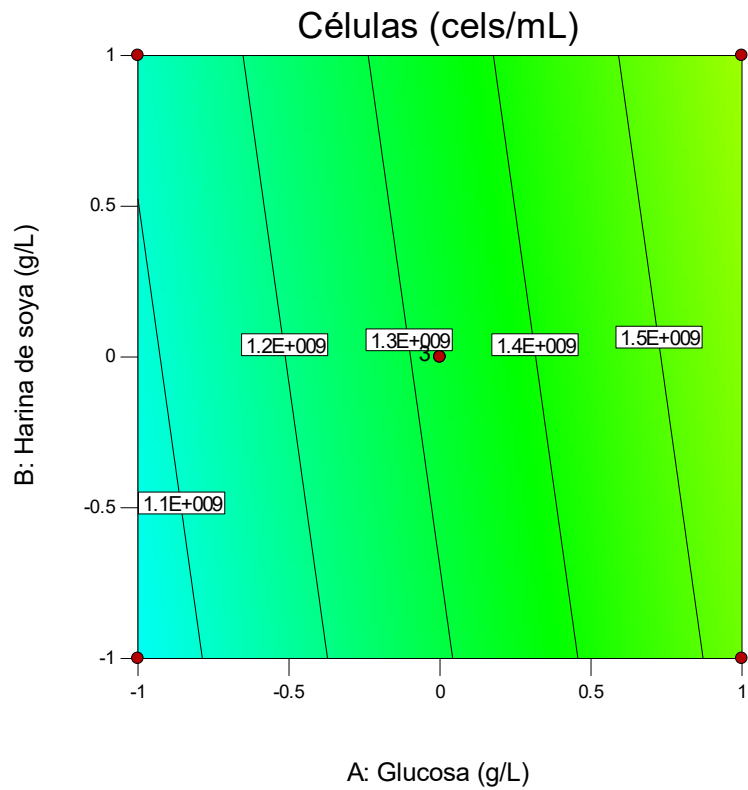
Desv Std	4.50	R-Cuadrado	0.8686
Media	7.34	Adj R-Cuadrado	0.6057
C.V. %	61.31	Pred R-Cuadrado	N/A
PRESS	N/A	Precisión Adq	3.471
-2 Log Likelihood	32.16	BIC	41.88
		AICc	102.16



Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Células (cels/mL)

● Design Points  
2.075E+009  
6.85E+008

X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



**Figura 7.** Gráfica de contorno del modelo lineal para el mapeo inicial (células).

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Células (cels/mL)

● Design points above predicted value

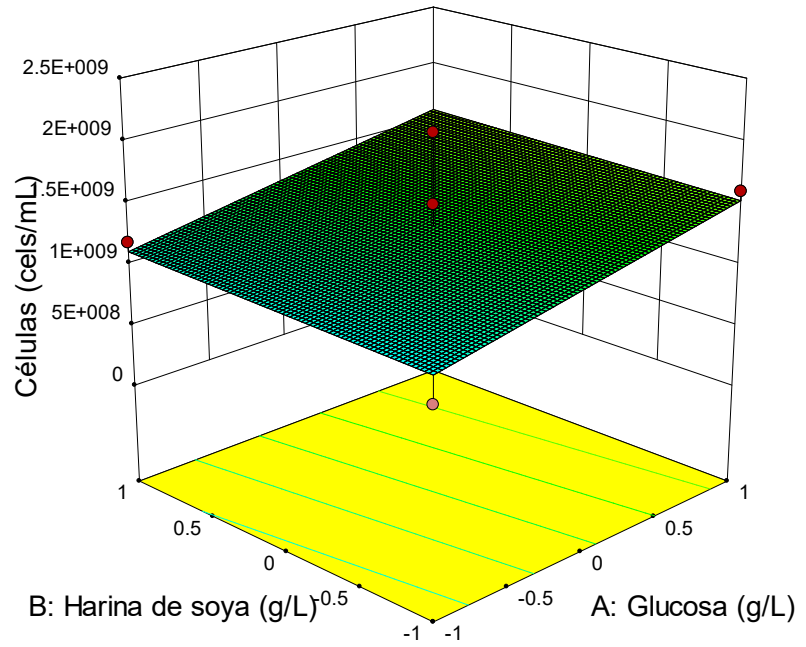
○ Design points below predicted value

2.075E+009

6.85E+008

X1 = A: Glucosa

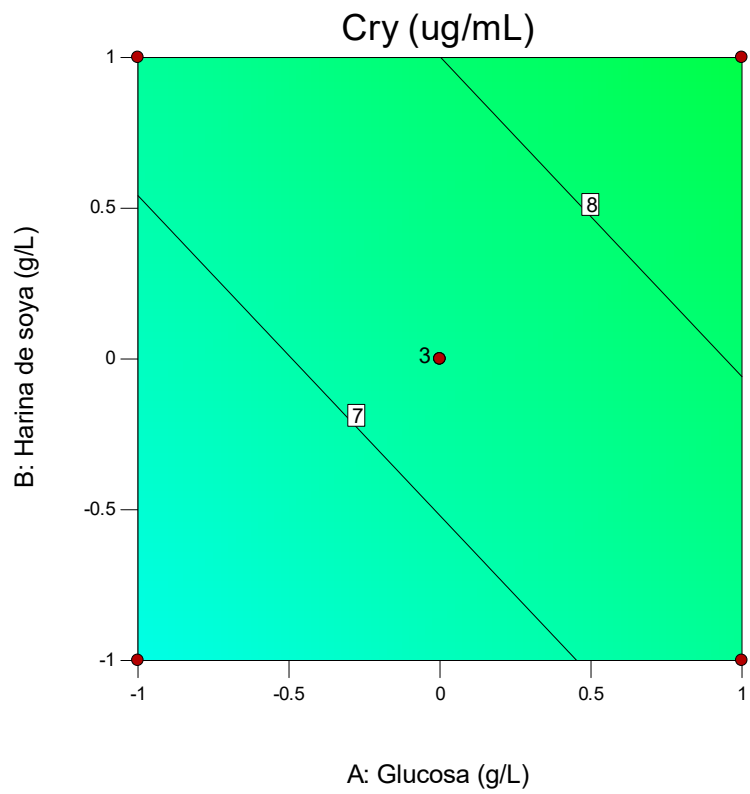
X2 = B: Harina de soya



**Figura 8.** Gráfica 3D del modelo lineal para el mapeo inicial (células).

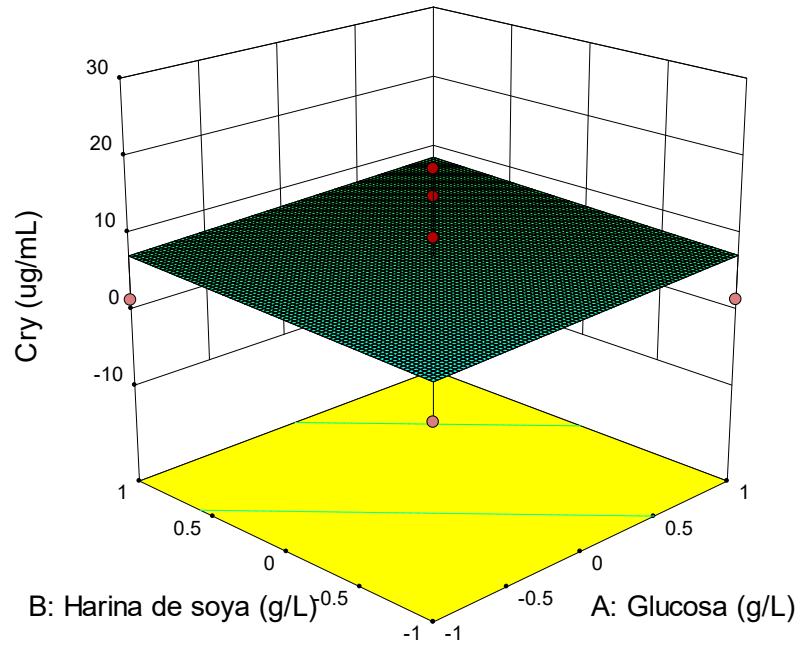
Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Cry (ug/mL)  
● Design Points  
18.5866  
1.21323

X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



**Figura 9.** Gráfica de contorno del modelo lineal para el primer mapeo (Cry).

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Cry (ug/mL)  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
18.5866  
1.21323  
X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya

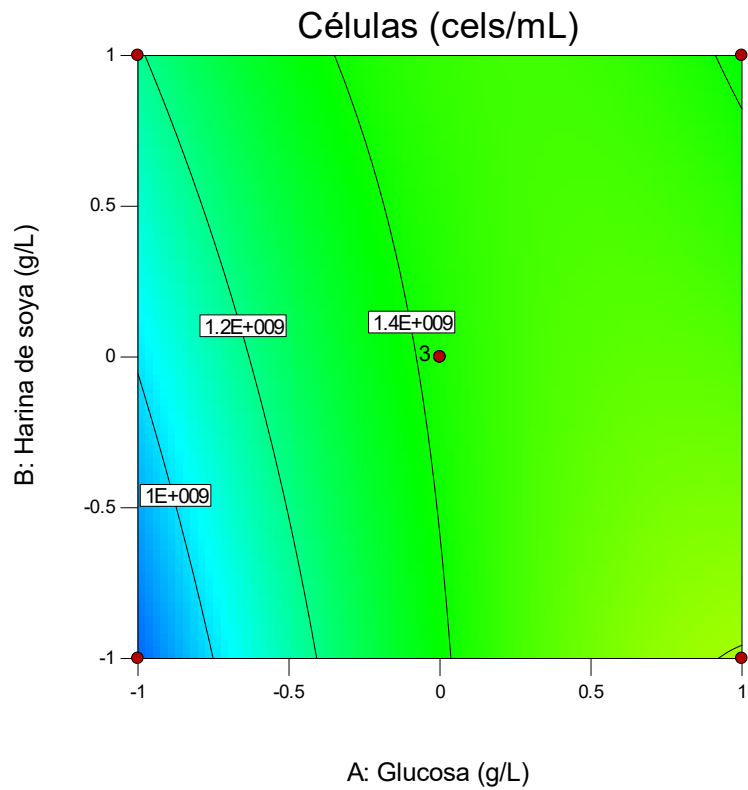


**Figura 10.** Gráfica 3D del modelo lineal para el mapeo inicial (Cry).

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Células (cels/mL)

● Design Points  
2.075E+009  
6.85E+008

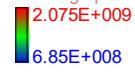
X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



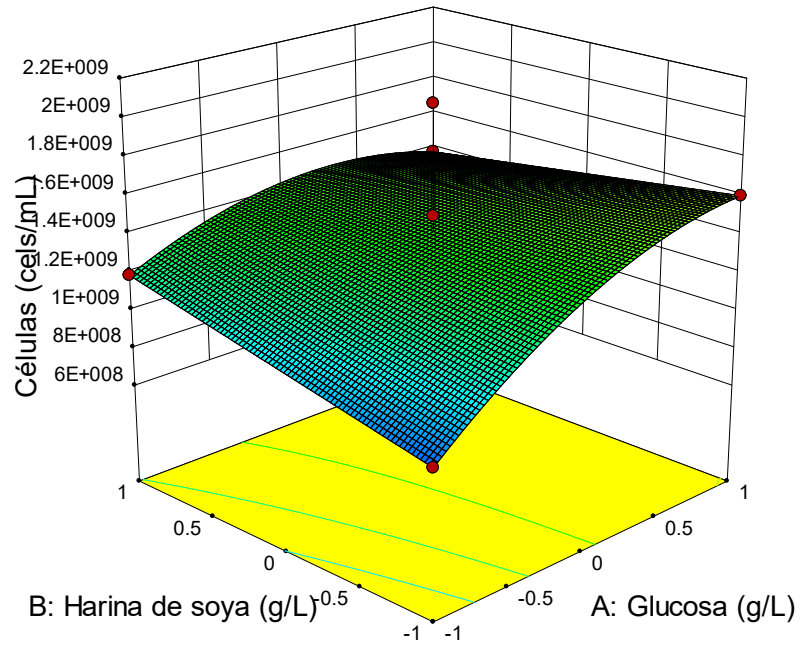
**Figura 11.** Gráfica de contorno del modelo cuadrático para el mapeo inicial (células).

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Células (cels/mL)

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value



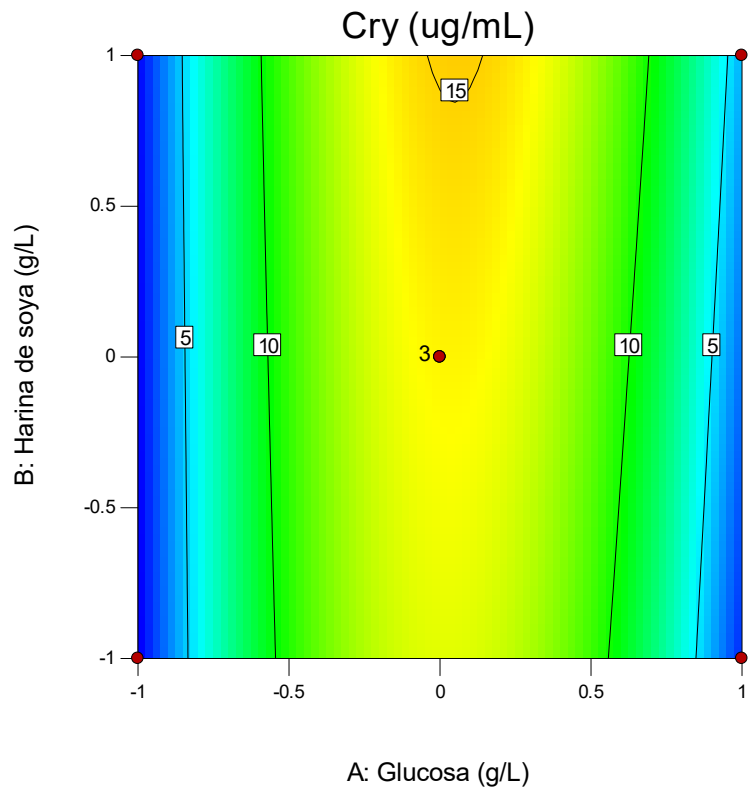
X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



**Figura 12.** Gráfica 3D del modelo cuadrático para el mapeo inicial (células).

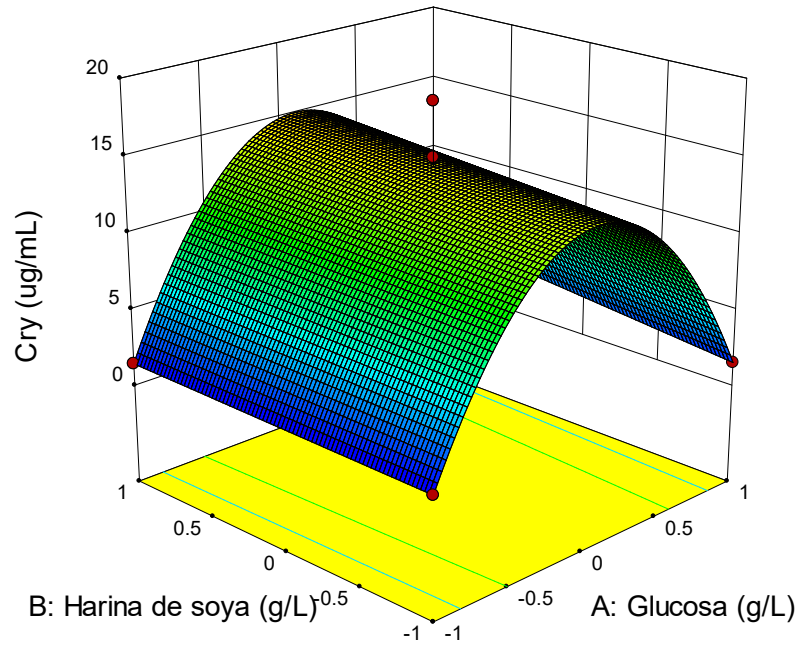
Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Cry (ug/mL)  
● Design Points  
18.5866  
1.21323

X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



**Figura 13.** Gráfica de contorno del modelo cuadrático para el mapeo inicial (Cry).

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Cry (ug/mL)  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
18.5866  
1.21323  
X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



**Figura 14.** Gráfica 3D del modelo cuadrático para el mapeo inicial (Cry).



**Cuadro 17.** Factores y variables de respuesta para el segundo mapeo de superficie de respuesta.

<b>No.</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A=Glucosa g/L</b>	<b>B=Harina de soya g/L</b>	<b>Cels/mL</b>	<b>Cry (ug/mL)</b>
1	-1	-1	37.00	22.50	8.3E+008	1.21
2	1	-1	57.00	22.50	1.61E+009	1.54
3	-1	1	37.00	32.50	1.19E+009	1.46
4	1	1	57.00	32.50	1.38E+009	3.92
5	-1.41	0	32.86	27.50	9.15E+008	2.74
6	1.41	0	61.14	27.50	1.005E+009	3.69
7	0	-1.41	47.00	20.43	1.255E+009	9.73
8	0	1.41	47.00	34.57	1.38E+009	13.59
9	0	0	47.00	27.50	2.08E+009	15.02
10	0	0	47.00	27.50	6.85E+008	18.59
11	0	0	47.00	27.50	1.5E+009	9.65

**Cuadro 18.** ANOVA del modelo cuadrático para los 11 puntos muestrales (células).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>df</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Prob &gt; F</b>	<b>Valor de p</b>
Modelo	4.886E+017	5	9.772E+016	0.45	0.8023	NS
<i>A-Glucosa</i>	1.505E+017	1	1.505E+017	0.69	0.4453	
<i>B-Harina de soya</i>	1.176E+016	1	1.176E+016	0.054	0.8261	
<i>AB</i>	8.703E+016	1	8.703E+016	0.40	0.5565	
<i>A<sup>2</sup></i>	2.313E+017	1	2.313E+017	1.05	0.3516	
<i>B<sup>2</sup></i>	3.157E+015	1	3.157E+015	0.014	0.9092	
Residual	1.097E+018	5	2.194E+017			
<i>Falta de Ajuste</i>	1.149E+017	3	3.831E+016	0.078	0.9661	NS
<i>Error Puro</i>	9.822E+017	2	4.911E+017			
Cor Total	1.586E+018	10				

NS = No Significativo

**Cuadro 19.** Valores de  $R^2$  del modelo cuadrático para los 11 puntos muestrales (células).

Desv Std	4.684E+008	R-Cuadrado	0.3081
Media	1.257E+009	Adj R-Cuadrado	-0.3838
C.V. %	37.26	Pred R-Cuadrado	-0.9091
PRESS	3.027E+018	Precisión Adq	1.789
-2 Log Likelihood	461.77	BIC	476.16
		AICc	494.77

**Cuadro 20.** ANOVA del modelo cuadrático para los 11 puntos muestrales (Cry).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>df</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Prob &gt; F</b>	<b>Valor de p</b>
Modelo	287.39	5	57.48	2.87	0.1361	NS
A-Glucosa	2.14	1	2.14	0.11	0.7572	
B-Harina de soya	8.19	1	8.19	0.41	0.5507	
AB	1.14	1	1.14	0.057	0.8209	
A <sup>2</sup>	273.03	1	273.03	13.63	0.0141	
B <sup>2</sup>	42.08	1	42.08	2.10	0.2070	
Residual	100.19	5	20.04			
Falta de ajuste	59.67	3	19.89	0.98	0.5403	NS
Error Puro	40.51	2	20.26			
Cor Total	387.58	10				

NS = No Significativo

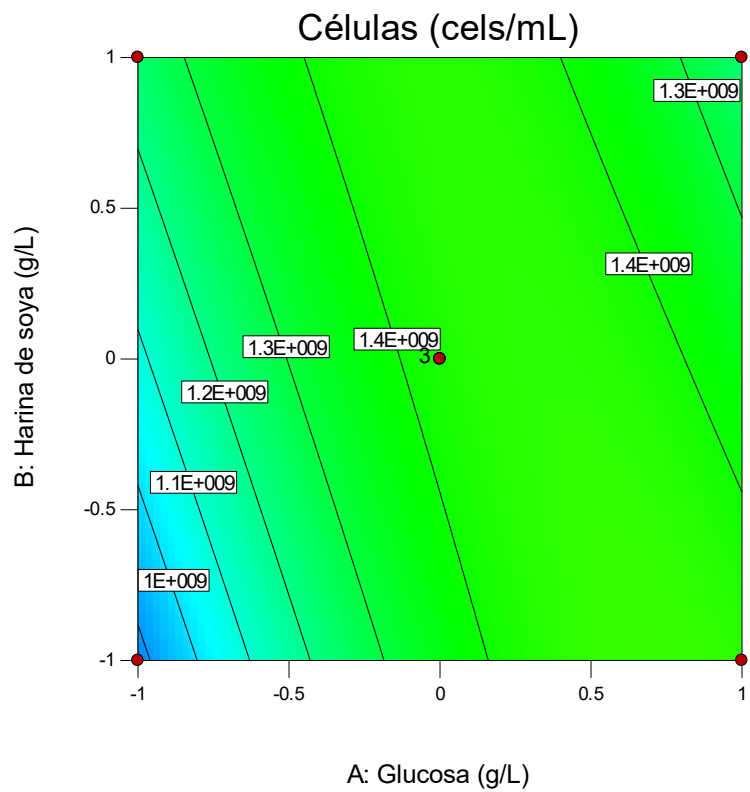
**Cuadro 21.** Valores de R2 del mapeo de superficie de respuesta (Cry).

<b>Desv Std</b>	<b>4.48</b>	<b>R-Cuadrado</b>	<b>0.7415</b>
Media	7.38	Adj R-Cuadrado	0.4830
C.V. %	60.69	Pred R-Cuadrado	-0.3300
PRESS	515.49	Precisión Adq	4.428
-2 Log Likelihood	55.52	BIC	69.90
		AICc	88.52

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Células (cels/mL)

● Design Points  
2.08E+009  
6.85E+008

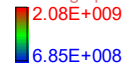
X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



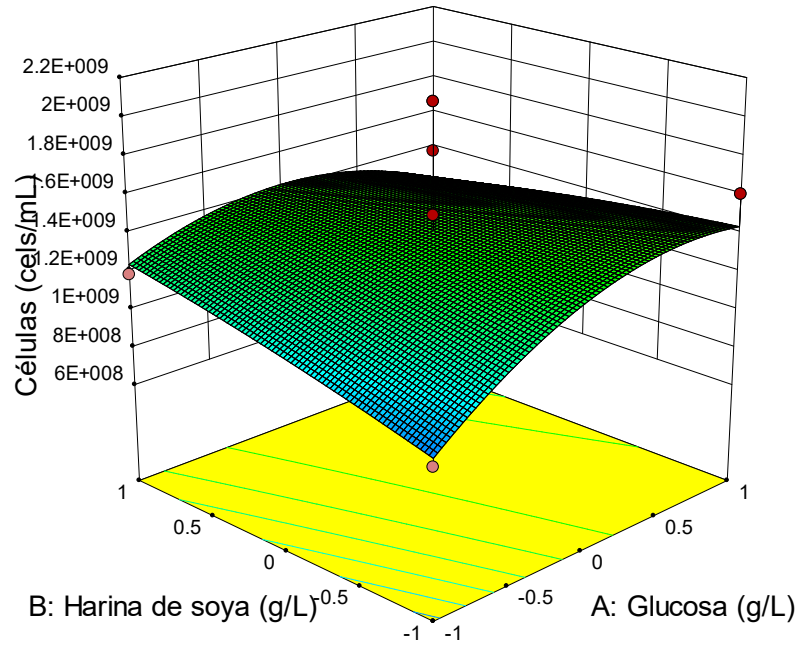
**Figura 15.** Gráfico de contorno del segundo mapeo de superficie de respuesta (Células).

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Células (cels/mL)

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

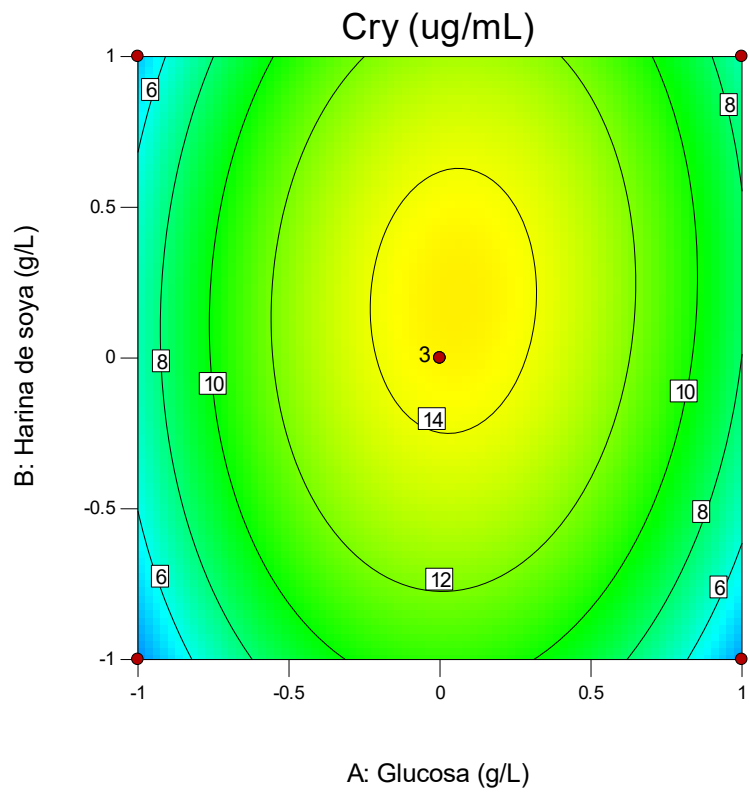


X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



**Figura 16.** Gráfico 3D del segundo mapeo de superficie de respuesta (Células).

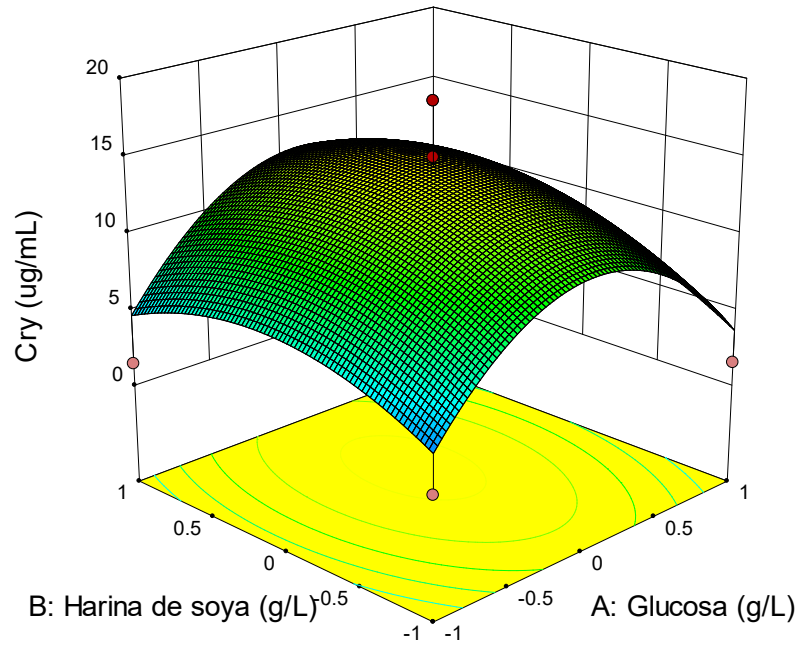
Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Cry (ug/mL)  
● Design Points  
18.5866  
1.21323  
X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



**Figura 17.** Gráfico de contorno del segundo mapeo de superficie de respuesta (Cry).

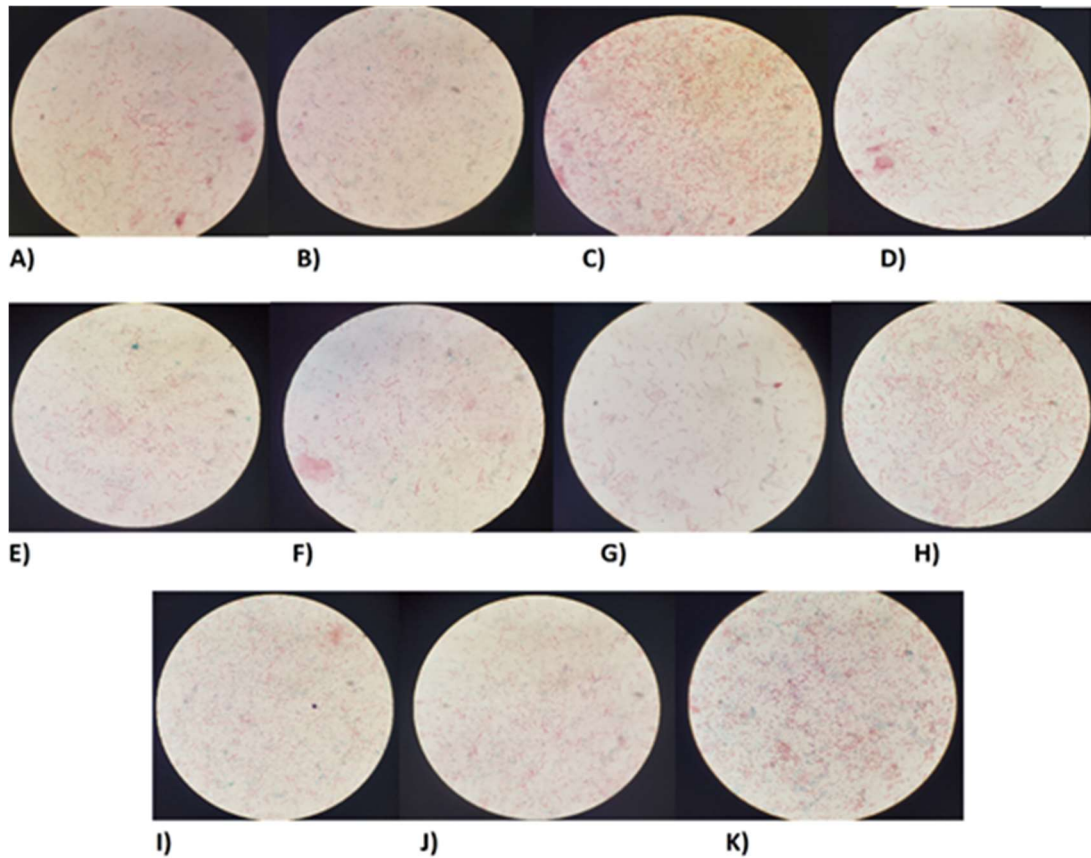


Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Cry (ug/mL)  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
18.5866  
1.21323  
X1 = A: Glucosa  
X2 = B: Harina de soya



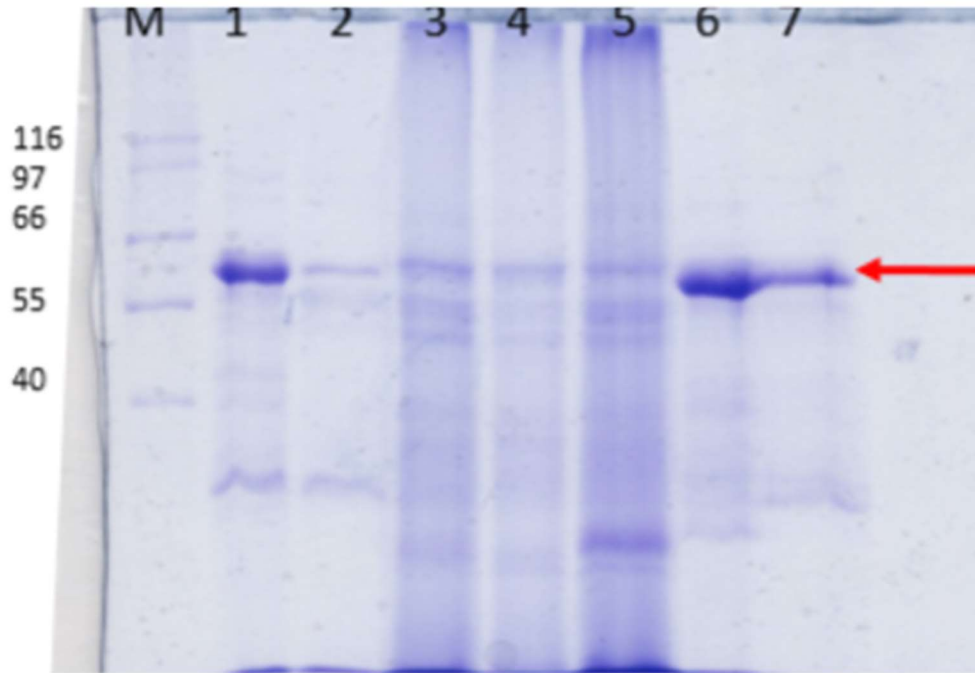
**Figura 18.** Gráfico 3D del segundo mapeo de superficie de respuesta (Cry).

Se observa una producción óptima de proteína en los puntos centrales del mapeo.



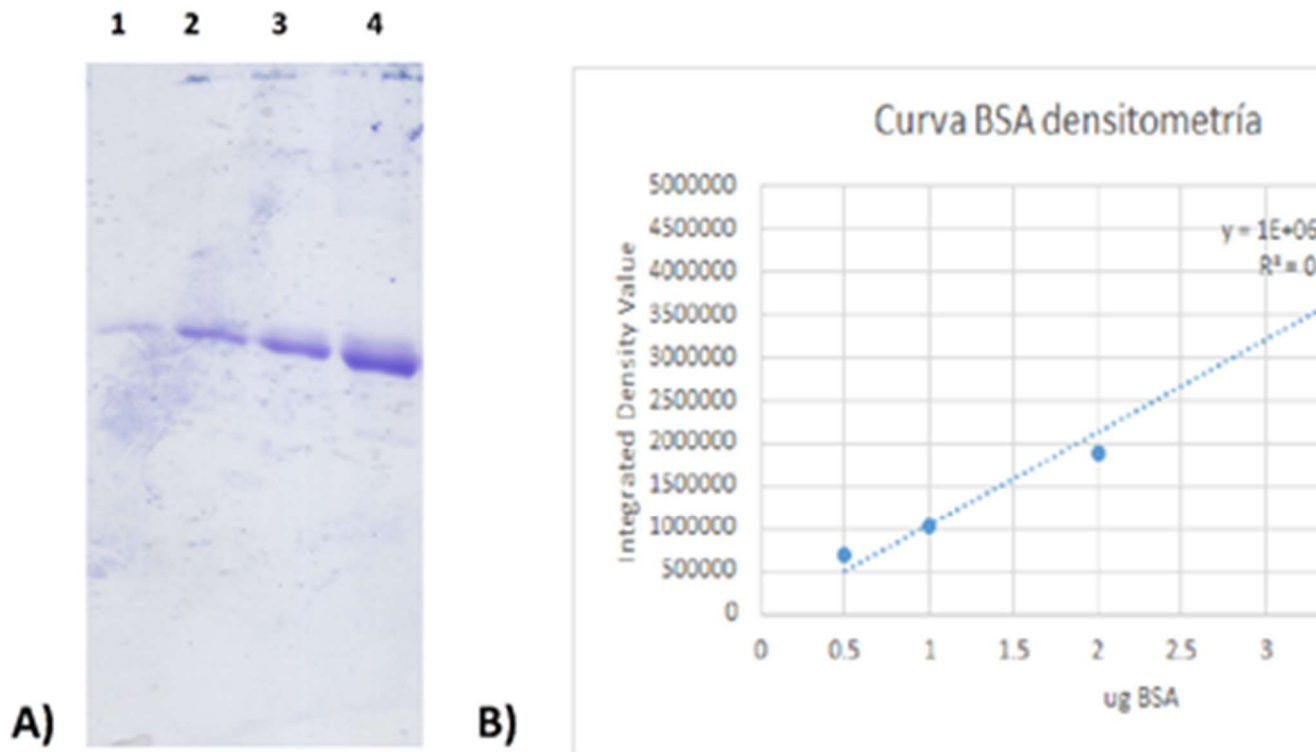
**Figura 19.** Tinción Scheffer-Fulton de las 11 observaciones de superficie de respuesta.

A) 37 g/L Glucosa, 22.5 g/L Harina de soya; B) 57 g/L glucosa, 22.5 g/L Harina de soya; C) 7 g/L glucosa, 32.5 g/L Harina de soya); D) 57 g/L glucosa, 32.5 g/L Harina de soya; E) 32.858 g/L glucosa, 27.5 g/L Harina de soya; F) 61.142 g/L glucosa, 27.5 Harina de soya; G) 47 g/L glucosa, 20.429 g/L Harina de soya; H) 47 g/L glucosa, 34.571 g/L Harina de soya; I) 47 g/L glucosa, 27.5 g/L Harina de soya; J) 47 g/L glucosa, 27.5 g/L Harina de soya; K) 47 g/L glucosa, 27.5 g/L Harina de soya.



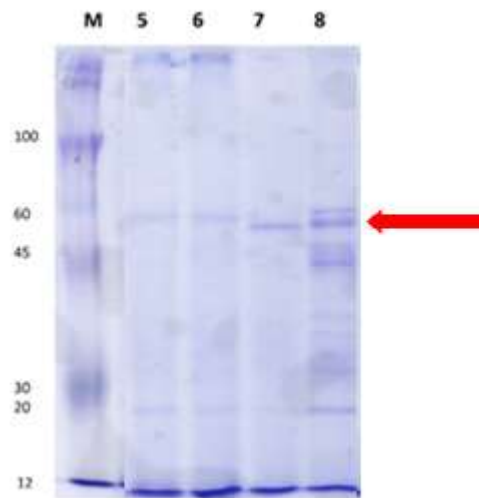
**Figura 20.** Perfil proteico de los 7 tratamientos de superficie de respuesta.

Con la flecha roja se señala la proteína de interés (Cry).



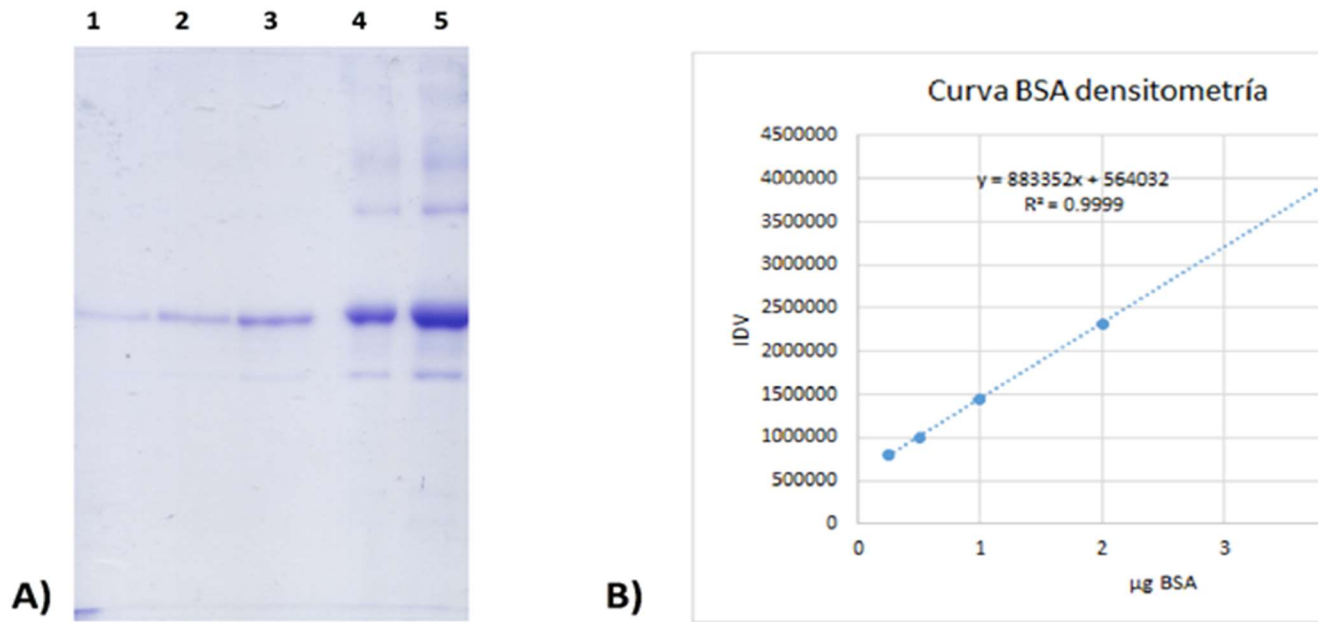
**Figura 21.** Curva estándar de BSA para densitometría de bandas.

A) Carril 1: 0.5  $\mu\text{g}$  de BSA, Carril 2: 1  $\mu\text{g}$  de BSA, Carril 3: 2  $\mu\text{g}$  de BSA, Carril 4: 4  $\mu\text{g}$  de BSA; B) Gráfica de  $\mu\text{g}$  de BSA vs. Valor de Densidad Integrada (IDV).



**Figura 22.** Perfil proteico de los puntos 5, 6, 7 y 8 del segundo mapeo de superficie de respuesta.

Estos perfiles representan cuatro los puntos muestrales con los que se complementó el mapeo.



**Figura 23.** Curva estándar de BSA para densitometría de bandas.

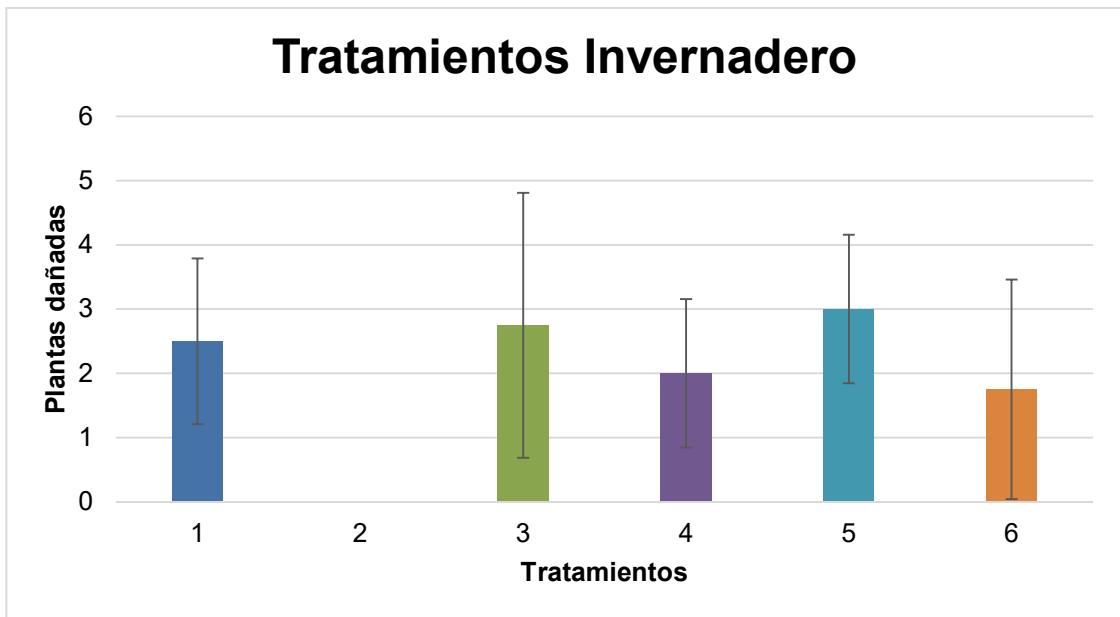
A) Carril 1: 0.25 µg de BSA, Carril 2: 0.5 µg de BSA, Carril 3: 1 µg de BSA, Carril 4: 2 µg de BSA, Carril 5: 4 µg de BSA; B) Gráfica de µg de BSA vs. Valor de Densidad Integrada (IDV).

#### **D. Efectividad del formulado contra *D. considerata* en cultivos de caña**

Una vez transcurrido un periodo de cuatro semanas después de la infestación artificial y la aplicación de los tratamientos se monitoreó el cultivo para detectar la presencia de plantas dañadas (es decir, con la muerte del meristemo apical, coloquialmente conocido como “corazón muerto”). Los canutos que presentaban daño fueron recolectados para su revisión en laboratorio, como se muestra en la Figura 25. Todas las larvas recuperadas de campo pertenecían a la especie con la que se infestó (*D. considerada*), por lo que se descartó la posibilidad de que otra plaga pudiese haber dañado o barrenado a las plantas de caña.

Se hizo el conteo de plantas dañadas en cada tratamiento (Figura 24), sin embargo se obtuvieron desviaciones estándares altas, por lo que al hacer ANOVA y comparación múltiple de medias (LSD) ningún tratamiento mostró diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al control (Cuadro 22), a excepción del tratamiento 2, el cual estaba representado por el control químico ( $p=0.02$ ). De los tratamientos biológicos el que menor daño promedio presentó fue el de la cepa regional con una dosis de 10 g/L.

Un comportamiento similar se tuvo en el trabajo realizado por Vejar en 2016, en el cual se trabajó sobre la misma plaga en pruebas de campo, sin embargo los patógenos usados fueron hongos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*. Es importante recalcar el hecho de que muchos factores pueden jugar un papel importante sobre la efectividad de un entomopatógeno, tales como grado de exposición al bioinsecticida, condiciones medioambientales prevalecientes, interacción fisiológica entre el hospedero y el patógeno, producción, formulación y método de aplicación usado (Vejar Cota, 2016).



**Figura 24.** Plantas dañadas por tratamiento.



**Cuadro 22.** Diferencia de medias de los tratamientos en invernadero.

Tratamiento	Media plantas dañadas (Media $\pm$ DE)
1	2.5 ( $\pm$ 1.29) <sup>a</sup>
2	0 ( $\pm$ 0) <sup>b</sup>
3	2.75 ( $\pm$ 2.06) <sup>a</sup>
4	2 ( $\pm$ 1.15) <sup>a,b</sup>
5	3 ( $\pm$ 1.15) <sup>a</sup>
6	1.75 ( $\pm$ 1.71) <sup>a,b</sup>

\*Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa (LSD,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 25.** Monitoreo de las plantas de caña al término del ensayo.

A) Plantas dañadas (muerte del meristemo apical); B) Galerías formadas por las larvas de barrenador de la caña; C) Larva de *D. considerata* recuperada de una planta infestada.

## IX. CONCLUSIONES

Se logró recuperar al menos una cepa virulenta contra *Diatraea considerata* de los lepidópteros colectados en campo. Dicha cepa mostró tener un mejor desempeño como agente de control que las cepas de referencia que se usan comercialmente contra plagas de lepidópteros.

Se logró hacer la optimización del medio para dicha cepa, lo que a futuro podría ser de utilidad para una producción masiva, sin embargo es necesario corroborar los resultados de invernadero y probar una mayor diversidad de formulaciones en muestras mucho más grandes, con el fin de buscar reducir las desviaciones estándar tan altas que normalmente se obtienen en este tipo de pruebas, además de que es conveniente probar los tratamientos en campos que estén infestados de manera natural.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M., & Pérez, J. F. (2004). Resultados del monitoreo para diagnóstico y control de poblaciones de barrenadores del tallo en caña de azúcar de los municipios: El Grullo-Autlán-El Limón en Jalisco. Primer año. . In INIFAP (Ed.).
- Arenas, I., Soberón, M., & Gómez, I. (2010). Role of Alkaline Phosphatase from *Manduca sexta* in the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(17), 12497–12503.
- Arenas Sosa, I. (2010). *El papel de la fosfatasa alcalina de Manduca sexta en el mecanismo de toxicidad de la toxina Cry1Ab de Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248-254.
- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B. I., Rodríguez-Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. (2012). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, 6, 17-26.
- Buenosaires Álvarez, A. I. (2014). *Interacción de Bacillus thuringiensis Y Metarhizium anisopliae SOBRE Diatraea magnifactella (DYAR)*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Cetinkaya, F. T. (2002). *Isolation of Bacillus thuringiensis and Investigation of Its Crystal Protein Genes* Izmir Institute of Technology
- Farrera, R. (1998). *Efecto del medio de cultivo sobre la esporulación y síntesis de CryIA(c) en Bacillus thuringiensis var kurstaki HD-73*. Instituto Politécnico Nacional.
- Fonseca G, A., Peña Chora, G., Trejo Loyo, A. G., Lina García, L. P., Rodríguez B, L. A., & Hernández Velázquez, V. M. (2013). Patogenicidad y virulencia de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del estado de Morelos sobre *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 29(3), 534-544.

- Hernandez-Rodriguez, C. S., Hernandez-Martinez, P., Van Rie, J., Escriche, B., & Ferre, J. (2013). Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE*, *8*(7), e68164.
- Lenina, N. K., Naveenkumar, A., Sozhavendan, A. E., Balakrishnan, N., Balasubramani, V., & Udayasuriyan, V. (2014). Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech*, *4*, 545-551.
- Liu, B.-L., & Tzeng, Y.-M. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*, *18*(6), 413-418.
- Lucena, W. A., Pelegrini, P. B., Martins-de-Sa, D., Fonseca, F. C. A., Gomes, J. E., de Macedo, L. L. P., da Silva, M. C. M., Oliveira, R. S., & Grossi-de-Sa, M. F. (2014). Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. *Toxins*, *6*(8), 2393-2423.
- Luo, K., Banks, D., & Adang, M. J. (1999). Toxicity, Binding, and Permeability Analyses of Four *Bacillus thuringiensis* Cry1  $\delta$ -Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *65*(2), 457-464.
- Mendoza Estrada, L. J., Hernández Velázquez, V. M., Arenas Sosa, I., Flores Pérez, F. I., Morales-Montor, J., & Peña Chora, G. (2016). Anthelmintic Effect of *Bacillus thuringiensis* Strains against the Gill Fish Trematode *Centrocestus formosanus*. *BioMed Research International*, 2016.
- Ortega Corona, A. (1987). *Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo*.
- 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.

- Ramos, L. H. M., García, N. M. R., Domínguez, J. F. P., & Wong, L. J. G. (2005). Evaluación en campo de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea sp.* *CIENCIA UANL*, 8(1), 74-79.
- Ritchie, M. E., & Raina, R. (2016). Effects of herbivores on nitrogen fixation by grass endophytes, legume symbionts and free-living soil surface bacteria in the Serengeti. *Pedobiologia*, 59(5), 233-241.
- Rodríguez del Bosque, L. A. (2009). Los barrenadores del tallo de la caña de azúcar en México. In): INIFAP.
- Rosas García, N. M., Pereyra Alferez, B., Niño, K. A., Gal'n-Wong, L. J., & Morales Ramos, L. H. (2004). Novel toxicity of native and HD *Bacillus thuringiensis* strains against to the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *BioControl*, 49(4), 455-465.
- Saoussen Ben, K., Amel, K., Samir, J., & Nabil, Z. (2011). Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by sporeless and sporulating strains using response surface methodology. *New Biotechnology*, 21(6).
- Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40, 124-140.
- Schaeffer, A. B., & Fulton, M. D. (1933). A SIMPLIFIED METHOD OF STAINING ENDOSPORES. *Science (New York, N.Y.)*, 77(1990), 194.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-806.
- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture. *ISRN Microbiology*, 2014, 135675.

- SEGOB. (2014). Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar 2014-2018. *Diario Oficial de la Federación (DOF)*.
- Seifinejad, A., Jouzani, G. R. S., Hosseinzadeh, A., & Abdmishani, C. (2008). Characterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Biological Control*, *44*(2), 216-226.
- Sikorowski, P., & Davis, F. M. (1970). Susceptibility of larvae of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*, to *Bacillus thuringiensis*. *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY*, *15*(1), 131-132
- SNV. (2008). Cultivos para la producción sostenible de biocombustibles: Una alternativa para la generación de empleos e ingresos. In).
- SY Wong, R., Mohamed, S. M., D Nadarajah, V., & Tengku, I. A. T. (2010). RCesheaarchacterisation of the Binding Properties of Bacillus Thuringiensis 18 Toxin on Leukaemic Cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.
- Tamez, P., Iracheta, M. M., Pereyra, B., W., L. G., Gómez, R., G., R. T., & P., C. R. (2005). Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros. *CIENCIA UANL*, *8*(4), 477-482.
- Tokcaer, Z., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü., Özcengiz, G., & Alaeddinoğlu, N. G. (2006). Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis HD 500. *Process Biochemistry*, *41*(2), 350-355.
- Trisyono, Y. A., & Chippendale, G. M. (2002). Susceptibility of field-collected populations of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*, to *Bacillus thuringiensis*. *Pest Manag Sci*, *58*(10), 1022-1028.
- Vejar Cota, G. (2010). Las plagas de la caña de azúcar y su importancia en El Valle del Fuerte, Sinaloa. In *Panorama Agropecuario*, vol. 217 (pp. 17-19).

- Vejar Cota, G. (2011). Análisis Descriptivo de las Principales Especies de Barrenadores de la Caña de Azúcar en México. In). Los Mochis, Sinaloa, México.
- Vejar Cota, G. (2016). *Evaluación de la efectividad de hongos entomopatógenos en barrenadores del tallo de la caña de azúcar (Lepidoptera: Crambidae) en Sinaloa*. Instituto Politécnico Nacional.
- Xu, C., Wang, B.-C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural Insights into Bacillus thuringiensis Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770.



## XI. ANEXOS

### A. Publicaciones

Document downloaded from <http://www.elsevier.es>, day 09/06/2017. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Bol Med Hosp Infant Mex. 2017;74(3):193–199



Boletín Médico del  
Hospital Infantil de México

[www.elsevier.es/bmhim](http://www.elsevier.es/bmhim)



RESEARCH ARTICLE

#### Characterization of Cry toxins from autochthonous *Bacillus thuringiensis* isolates from Mexico



Raquel Camacho-Millán<sup>a</sup>, Elsa Maribel Aguilar-Medina<sup>a</sup>, Héctor Quezada<sup>b</sup>,  
Óscar Medina-Contreras<sup>b</sup>, Genaro Patiño-López<sup>b</sup>, Héctor Manuel Cárdenas-Cota<sup>c</sup>,  
Rosalío Ramos-Payán<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Universidad Tecnológica de Culiacán, Culiacán, Sinaloa, Mexico

Received 24 January 2017; accepted 27 March 2017

Available online 10 May 2017

#### KEYWORDS

Toxin;  
Proteomics;  
*Diatraea considerata*;  
*Bacillus thuringiensis*

#### Abstract

**Background:** Chemical pesticides, widely used in agriculture and vector-borne disease control, have shown toxic effects on the environment and the people in contact with them. *Bacillus thuringiensis* is a widely used bacterium for alternative and safer control of insect pests. Its toxins are specific for insects but innocuous for mammals and may be used as powerful adjuvants when applied with vaccines. The objective of this work was to characterize some autochthonous *B. thuringiensis* strains, which could be used for the control of a local pest (*Diatraea considerata* Heinrich) that affects sugar cane crops in Sinaloa, Mexico. Also, to evaluate these strains as a source of Cry toxins, which may be used in the future as adjuvants for some vaccines.

**Methods:** Eight strains from field-collected dead insects were isolated. These were microbiologically identified as *B. thuringiensis* and confirmed by amplification and sequencing of 16S rDNA. Bioassays were performed to evaluate their pathogenicity against *D. considerata*, and Cry toxins were identified by proteomic analyses.

**Results:** An increased mortality among larvae infected with strain Bt-D was observed, and its toxin was identified as Cry1Ac.

**Conclusions:** The observed data showed that the selected strain was pathogenic to *D. considerata* and seemed to produce Cry1Ac protein, which has been reported as an adjuvant in different types of immunization.

© 2017 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author.

E-mail address: [rosaliorp@uas.edu.mx](mailto:rosaliorp@uas.edu.mx) (R. Ramos-Payán).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhimx.2017.03.002>

1665-1146/© 2017 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Artículo científico publicado en el Boletín Médico del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Biofertilizer formulation from *Azotobacter* and *Azospirillum* regional isolates and its effect on sugar cane (*Saccharum officinarum*) in greenhouse

### Formulación de biofertilizantes a partir de aislados regionales de *Azotobacter* y *Azospirillum* y su efecto en cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en casa sombra

Luis Fernando Nava-López<sup>1</sup>, Raquel Camacho-Millán<sup>1</sup>, Elsa Maribel Aguilar-Medina<sup>1</sup>, José Guillermo Romero-Navarro<sup>1</sup>, Rogelio Sosa-Pérez<sup>2</sup>, Aida Isamar Ruiz-Abitia<sup>1</sup>, Héctor Manuel Cárdenas-Cota<sup>2,3</sup>, Rosalío Ramos-Payán<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Josefa Ortiz de Domínguez S/N y Avenida de las Américas, Ciudad Universitaria. Culiacán, Sinaloa, México, CP 80010. <sup>2</sup>Centro de Ciencias de Sinaloa. Av. de las Américas 2771 Nte., Culiacán, Sinaloa, México, CP 80010. <sup>3</sup>Universidad Tecnológica de Culiacán, carretera Culiacán-Imala Km. 2, CP 80014. \*Email: [rosaliorp@uas.edu.mx](mailto:rosaliorp@uas.edu.mx)

#### ABSTRACT

The anthropogenic activity has damaged the ecological niches of all agricultural regions. Culiacan Valley in Sinaloa, México, is not an exception; it has more than one million agricultural hectares. This soil has a high salt index and is susceptible to erosion, which reduces the amount of the microbiota responsible for processes of oxidation-reduction and conversion of essential nutrients for plant nutrition. The global trend in agriculture is to develop alternatives of biological origin, for example plant growth promoting bacteria (PGPB), especially nitrogen-fixing and phytohormone producers genera. In this study, indigenous isolates of *Azotobacter* and *Azospirillum* from Sinaloa were characterized and compared against four nitrogen-fixing collection strains, in order to create a formulate that could prevent or decrease the need of mineral fertilizers applications, to enhance sustainable production of sugarcane (*Saccharum officinarum*). Ten isolates and four reference strains with biofertilization potential were evaluated, showing genotypic and phenotypic characteristics proper of their genera. The acetylene reduction assays showed that all strains and isolates reduce *in vitro* acetylene to ethylene by nitrogenase enzyme. Greenhouse tests with nitrogen fixing bacteria showed adaptation of bacteria to the sugar cane rhizosphere, suggesting that these isolates are eligible to develop biofertilizers.

Keywords: *Azospirillum*, *Azotobacter*, nitrogen fixation, sugarcane.

Artículo publicado en la revista Mexican Journal of Biotechnology.

## Congresos

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
A TRAVÉS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, FACULTAD DE MEDICINA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PARA LA SALUD PÚBLICA

OTORGA LA PRESENTE

# Constancia

A

**CAMACHO-MILLÁN RAQUEL, RUIZ-ABITIA AIDA ISAMAR, NAVA-LÓPEZ LUIS FERNANDO, AGUILAR-MEDINA ELSA MARIBEL, ROMERO-QUINTANA JOSÉ GEOVANNI, RAMOS-PAYÁN ROSALIO, CÁRDENAS-COTA HÉCTOR MANUEL.**

POR SU PARTICIPACIÓN COMO **PONENTES** EN EL **TRABAJO LIBRE**

**Desarrollo de bioproductos para una eficiente producción sustentable de caña de azúcar.**

PRESENTADO EN EL

**PRIMER CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

REALIZADO DEL 25 AL 28 DE NOVIEMBRE DE 2015, EN LA CIUDAD DE MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO.

ATENTAMENTE  
"SURSUM VERSUS"  
CULIACÁN ROSALES SINALOA, MÉXICO, 28 DE NOVIEMBRE DE 2015

**DR. JUAN ENRIQUE GUERRA LIERA**  
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

*Sylvia Paz Díaz Camacho*  
**DRA. SYLVIA PAZ DÍAZ CAMACHO**  
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR

Presentación del trabajo en el Congreso Internacional de Biomedicina 2015.



Se deja constancia que

*F Rivera-Chaparro, R Camacho-Millán, A Ruiz-Abitia, R García-Vázquez, M Aguilar-Medina, J Romero-Quintana, H Cárdenas-Cota, R Ramos-Payán*

participó en calidad de

Presentador/es de Poster

*Elaboración de un formulado a base de una cepa regional de Bacillus thuringiensis para el control de Diatraea considerata*

**Rosario, Santa Fe, Argentina. 26 al 30 de Septiembre de 2016**

Marcelo Galas  
Presidente ALAM-CAM

Hector Morbidoni  
Presidente SLAMTB

Graciela Torno  
Presidente CLAMME

Gustavo Giusiano  
Presidente AAM

Manuel Gómez Carrillo  
Presidente ALAM

Presentación del trabajo en el Congreso Latinoamericano y Argentino de Microbiología 2016, en modalidad cartel.





Presentación en el Congreso Nacional de Control Biológico 2016, modalidad Ponencia oral.