



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

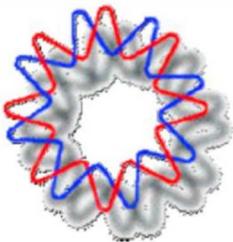
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

Desarrollo de un marcador molecular
específico para el agente de control biológico
Bacillus sp. 83

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
IBT. Wendy Ivette Aragón Gómez

TUTOR: Dr. Enrique Galindo Fentanes



Cuernavaca, Morelos

Agosto, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología y en el laboratorio de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Galindo Fentanes y la asesoría tanto de la Dra. Esperanza Martínez Romero como del Dr. Jesús Caballero Mellado[†].

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN-222010.

Dedicatorias

A mis padres

Efrén y Vilma: Por su amor, apoyo incondicional, por su confianza, por sus palabras de aliento en esta “senda desafiante” de la Maestría y por todo lo que han hecho por mí y de mí. Por no dudar nunca de mis decisiones y por haberme dado la mejor herencia que se puede recibir, la educación.

A mi hermano

Freddy: Gracias a su ejemplo, amor, confianza y ayuda cuando me enfrenté a dudas académicas siempre estuvo para orientarme.

A mi cuñada y sobrinos

Ruth, además de concederme junto con mi hermano, el privilegio de conocer a mis dos grandes amores Daniel y José Antonio, por quienes pretendo ser mejor cada día para darles buen ejemplo.

A toda mi familia, por preocuparse por mí desde la distancia.

Al Dr. Jesús Caballero Mellado[†]

A mi amigo médico, Dr. Víctor de la Rosa

Quien siempre ha confiado en mí y por concederme tiempo para consultas médicas a distancia.

A mis dudas y miedos

Porque gracias a que los he podido controlar, he logrado cumplir uno de mis sueños.

Queda prohibido llorar sin aprender, levantarte un día sin saber qué hacer, tener miedo a tus recuerdos.

Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres, abandonarlo todo por miedo, no convertir en realidad tus sueños.

Queda prohibido no hacer las cosas por ti mismo, tener miedo a la vida y a sus compromisos.

Queda prohibido no crear tu historia.

(Pablo Neruda)

Agradecimientos

Ahora que llegó el momento de escribir estas palabras, quiero agradecer a muchas personas e instituciones que estuvieron conmigo durante este período de la maestría.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (Instituto de Biotecnología y Centro de Ciencias Genómicas)** por permitirme ser parte de ella y por las facilidades otorgadas como la disponibilidad de los materiales y equipos empleados para la realización de este trabajo.

A mi tutor, Dr. Enrique Galindo Fentanes, por su confianza, sus enseñanzas, su dedicación para dirigirme en la elaboración de este proyecto y por inspirar en mí mucha admiración.

Al Dr. Jesús Caballero Mellado[†], por su apoyo y ayuda, me enseñó a ver las adversidades como oportunidades al permitirme formar parte de su laboratorio y recibirme con gusto cuando me incorporé. Aunque ya no está presente físicamente, pero podrá ver desde dondequiera que se encuentre la culminación de este proyecto que juntos empezamos y aún cuando ya no se encontraba, me guió hacia las personas que me ayudaron a terminar este trabajo. Fue y será mi ángel académico.

A los **Drs. Carlos Peña y Leobardo Serrano Carreón**, por sus comentarios y aportaciones en los seminarios.

Al Comité Tutorial:

Dra. Esperanza Martínez Romero, por permitirme trabajar y ser una integrante más de su grupo de investigación (Lab. de Ecología Genómica, CCG-UNAM), por su tiempo, comentarios y discusiones sobre los resultados de este trabajo. **Dr. Mario Rocha Sosa**, por su tiempo para asistir a mis evaluaciones y comentarios aportados.

Miembros del Jurado:

Dr. Edmundo Calva Mercado (Presidente)

Dr. Mario Soberón Chávez (Secretario)

Dr. Enrique Merino Pérez (Vocal)

Dra. Clarita Olvera Carranza (Vocal)

Dr. Leopold Fucikvosky Zak[†] (Vocal), mención aparte, por la oportunidad que tuve de conocerlo y de escuchar por su propia voz su historia en el mundo de la fitopatología.

Gracias a todos por darse un espacio en su tiempo para revisar esta tesis y emitir sus comentarios para enriquecer el trabajo.

Quiero extender mi agradecimiento al **M.C. Marco Antonio Rogel Hernández** por transmitirme sus conocimientos en las técnicas empleadas, por sus sugerencias, por brindarme su valiosa ayuda en los experimentos, por su buen humor que siempre me hicieron ver las cosas diferentes y sobretodo por la amistad brindada durante mi estancia en el laboratorio de Ecología Genómica (CCG-UNAM), eso jamás se olvida, infinitamente, gracias.

A la **Dra. Aline López López**, por su tiempo para orientarme en los experimentos y transmitirme sus conocimientos, así como también por su amistad dentro y fuera del laboratorio.

A la **Dra. María Julia Althabegoiti**, por sus conocimientos, comentarios y tiempo tan valiosos aportados a la redacción de esta tesis y por su amistad durante mi estancia en el laboratorio de Ecología Genómica.

Al **Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández** del **Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY)** por las facilidades otorgadas para mi estancia en la realización de una parte del trabajo.

A **M.B. Martha Giles Gómez** del cepario de la Facultad de Química de la UNAM, a **Dr. Adelfo Escalante**, **Dr. Guillermo Gosset**, **Q.I. Luz Ma. Martínez Mejía** y **M.B. Ma. Luisa Tabche** por proporcionarme las cepas utilizadas en este trabajo.

Dra. Ma. Soledad Córdova Aguilar por su valioso apoyo académico, administrativo y emocional; y a **M.C Celia Flores Ocampo** por su apoyo administrativo y por su amistad.

A los **integrantes del grupo del Dr. Jesús Caballero[†]**, quienes con gusto me recibieron y me permitieron conocerlos y aprender de ellos en el poco tiempo que compartimos el laboratorio de Ecología Genómica.

A las personas del “otro pasillo” del laboratorio de Ecología Genómica (grupo Otto/Martínez) con las que compartí horas de laboratorio y buenos momentos: **Miguel** (por sus conocimientos en Biología Molecular), **Diana**, “**Luis**”, **Mario**, **Napo**, **Martha**, **Tabita**, **Rosa** y **Ángel**.

A mis compañeros y nuevos amigos de laboratorio que conocí en Genómicas, **Emilio**, **Arturo** (por sus conocimientos y ayuda en la construcción de la Filogenia), **Eunice**, **Paquito**, **Víctor**, **Fabis** y **Roger**, con quienes he compartido las horas de comida, agradables charlas, tristezas, triunfos y conocimientos en estos últimos meses. Y para los que ya no están como **Yessi**, gracias por tu amistad, por ser mi cómplice desde que nos conocimos, por escuchar mis penas y por vivir momentos muy bonitos y difíciles que quedarán guardados en mi memoria por siempre.

A mis compañeros del laboratorio del “grupo Galindo”, los que están: **Sergio**, **Alehlí**, **Diana**, **Tania**, **Modesto** y los que ya se fueron pero que me apoyaron y me brindaron su amistad: **Claudia**, **Quique** y **Ana Laura**. Un agradecimiento especial para **Andrés** y **Erika** por ser mis primeros amigos cuando llegué al laboratorio del “grupo Galindo” y a la ciudad de Cuernavaca, gracias por su amistad incondicional.

De igual forma, a mis compañeros de maestría de la generación 2010-2: **María**, **Paloma**, **Elva**, **Leidy**, **Esteban**, **Luis**, **Mitsue**, **Silvia**, **Alyeri**; y a los de Biología Molecular: **Lili** y **Jaz**; por compartir sus conocimientos y enseñarme a ser perseverante, competitiva y por la amistad que me brindaron.

Mis grandes amigos y cómplices: **Eduardo**, **Inés**, **Luisa**, **Mau**, **Moni**, y **Barragán**, aunque la distancia ponga una barrera para vernos, les aseguro que nunca los voy a olvidar.

No quisiera terminar esta parte, sin antes agradecer también a aquellas personas que de manera directa e indirecta contribuyeron a mi formación académica, además de su comprensión y consejos: Unidad de Docencia del IBT (**Antonio**, **Gloria** e **Ing. Jalil**), administrativos del “grupo Galindo” y de Genómicas (**Lety** y **Lucy**), al personal de apoyo del Lab. de Ecología Genómicas por su ayuda y agradables pláticas (**Sr. Martín** y **Sra. Araceli**), **Sr. Adrián** (por llevarme a la Av. Universidad en los días de mucho trabajo en el laboratorio) y finalmente, a la **Sra. Jose** y **Sr. Toño** por su enorme cariño.

Índice General

Índice General	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tablas.....	v
Abreviaturas	vi
Resumen.....	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	6
2.1. Control biológico de enfermedades	6
2.2. Género <i>Bacillus</i> como agente de control biológico de enfermedades.....	6
2.2.1. Mecanismos de control de fitopatógenos por el género <i>Bacillus</i>	9
2.2.1.1. Control mediado por antibiosis	10
2.2.1.2. Competencia por espacio y/o nutrientes	11
2.2.1.3. Resistencia sistémica inducida en plantas (RSI)	12
2.3. <i>Bacillus</i> sp. 83 como agente de control biológico	13
2.3.1. Antracnosis.....	13
2.3.2. <i>Bacillus</i> sp. 83 antagonista de <i>C. gloeosporioides</i>	14
2.4. Seguimiento de agentes de control biológico	15
2.4.1. Métodos microbiológicos y directos	15
2.4.2. Métodos moleculares	17
3. Hipótesis y Objetivos	20
3.1. Hipótesis.....	20
3.2. Objetivos	20
3.2.1. General.....	20
3.2.2. Específicos	20
4. Materiales y Métodos.....	21
4.1. Estrategia experimental	21
4.2. Cepas y Plásmidos	22
4.3. Aislamiento de cepas de <i>Bacillus</i> spp. de suelo	23
4.4. Conservación de cepas.....	24
4.5. Medios de cultivo y suplementos.....	24
4.6. Purificación de DNA bacteriano	25
4.7. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5- α	25
4.8. Caracterización molecular parcial de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	26
4.8.1. Identificación molecular de <i>Bacillus</i> sp. 83	26
4.8.2. Amplificación de genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos producidos por <i>Bacillus</i> sp. 83.....	28
4.9. Análisis de huellas genómicas de <i>Bacillus</i> sp. 83	29
4.9.1. Polimorfismos del DNA de <i>Bacillus</i> sp. 83 amplificados al azar (RAPD)	30
4.9.2. Amplificación de secuencias de los elementos BOX de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	31
4.9.3. Amplificación de elementos ERIC de <i>Bacillus</i> sp. 83	31
4.9.4. Separación de los productos rep-PCR y RAPDs amplificados en gel de agarosa.....	31

4.10. Clonación y secuenciación de los fragmentos RAPD, BOX y ERIC seleccionados	31
4.10.1. Clonación de los fragmentos de <i>Bacillus</i> sp. 83	31
4.10.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5- α	32
4.10.3. Selección de colonias y análisis de transformantes.....	32
4.10.4. Secuenciación de los fragmentos seleccionados de RAPD, BOX y ERIC, y perfil genómico obtenido con BOX-A1R.....	33
4.11. Diseño de un procedimiento de identificación basado en un marcador molecular	33
4.11.1. Diseño y evaluación de los oligonucleótidos como posibles marcadores.....	33
4.11.2. Evaluación de la especificidad de los marcadores.....	34
4.11.3. Evaluación del límite de detección de los marcadores	34
5. Resultados y Discusión	39
5.1. Confirmación de los aislados de Yucatán como integrantes del género <i>Bacillus</i>	39
5.2. Caracterización molecular parcial de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	40
5.2.1. Determinación de la especie del agente de biocontrol <i>Bacillus</i> sp. 83	40
5.2.2. Amplificación de genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos producidos por <i>Bacillus</i> sp. 83.....	43
5.3. Determinación de huellas genómicas de <i>Bacillus</i> sp. 83	46
5.3.1. Análisis y selección del fragmento RAPD	46
5.3.2. Análisis y selección del fragmento BOX.....	48
5.3.3. Análisis y selección del fragmento ERIC.....	49
5.4. Selección y secuenciación de fragmentos	50
5.5. Desarrollo del marcador para <i>Bacillus</i> sp. 83	53
5.5.1. Selección de secuencias y diseño de marcadores.....	53
5.5.2. Evaluación de los marcadores diseñados para <i>Bacillus</i> sp. 83	60
5.5.3. Especificidad de los marcadores	62
5.5.4. Límite de detección de los marcadores	65
6. Conclusiones	68
7. Perspectivas	69
8. Referencias Bibliográficas.....	70
9. Anexos.....	78
9.1. Preparación de soluciones.....	78
9.2. Prueba de antagonismo de <i>Bacillus</i> sp. 83	79
9.3. Mapa del vector pTZ57R/T	80
9.4. Análisis de transformantes y purificación de plásmidos usados en el estudio	81
9.4.1. Análisis de colonias transformantes.....	81
9.4.2. Plásmidos purificados	82
9.5. Pérofiles genómicos de cepas similares a <i>Bacillus</i> sp. 83	82

Índice de Figuras

Figura 2.1. Mecanismos más importantes para el control biológico de enfermedades de plantas mediados por bacterias.....	9
Figura 4.1. Esquema de la estrategia general realizada en este trabajo	21
Figura 4.2. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en el estado de Yucatán, para el aislamiento de cepas pertenecientes al género <i>Bacillus</i> en plantaciones de papaya	24
Figura 4.3. Colonias del agente de control biológico <i>Bacillus</i> sp. 83 crecidas en a) medio LB, b) estructura de <i>biofilm</i> en medio LB sólido y c) <i>biofilm</i> en medio LB líquido.....	26
Figura 4.4. Estrategia para evaluar la capacidad de los marcadores diseñados para <i>Bacillus</i> sp. 83 con concentraciones conocidas de DNA de la bacteria	35
Figura 4.5. Estrategia para evaluar la capacidad de los marcadores diseñados, con DNA de células vegetativas de <i>Bacillus</i> sp. 83 asperjadas en hojas de papayo	36
Figura 4.6. Estrategia para evaluar la capacidad de los marcadores diseñados, con DNA de esporas de <i>Bacillus</i> sp. 83 presentes en el formulado <i>Fungifree AB</i> ® asperjadas en hojas de papayo	37
Figura 5.1. Identificación de los aislados del estado de Yucatán pertenecientes al género <i>Bacillus</i> mediante la amplificación del gen <i>recA</i>	39
Figura 5.2. Fragmentos amplificados de los genes a) 16S rDNA y b) <i>recA</i> de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	41
Figura 5.3. Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la secuencia del gen <i>recA</i> de <i>Bacillus</i> sp. 83, indicando la relación filogenética que existe entre la cepa y otros representantes del género <i>Bacillus</i>	42
Figura 5.4. Productos de amplificación de genes involucrados en la síntesis de los antibióticos a) surfactina, b) bacilomicina D y c) macrolactina A	44
Figura 5.5. Perfiles genómicos RAPD de <i>Bacillus</i> sp. 83 y cepas de referencia obtenidos con el oligonucleótido OPG-11	47
Figura 5.6. Perfiles genómicos RAPD de <i>Bacillus</i> sp. 83 y cepas aisladas de Yucatán, obtenidos con el oligonucleótido OPG-11	47
Figura 5.7. Perfiles genómicos BOX de <i>Bacillus</i> sp. 83 y cepas de referencia obtenidos con el oligonucleótido BOX-A1R.....	48
Figura 5.8. Perfiles genómicos BOX de <i>Bacillus</i> sp. 83 y cepas aisladas de Yucatán obtenidos con el oligonucleótido BOX-A1R	48
Figura 5.9. Perfiles genómicos ERIC de <i>Bacillus</i> sp. 83 y cepas de referencia obtenidos con los oligonucleótidos ERIC 1R/ERIC 2	49
Figura 5.10. Perfiles genómicos ERIC de <i>Bacillus</i> sp. 83 y cepas aisladas de Yucatán, obtenidos con los oligonucleótidos ERIC 1R/ERIC 2	49
Figura 5.11. Fragmentos de DNA de <i>Bacillus</i> sp. 83 seleccionados de los perfiles RAPD, BOX y ERIC. (a) Corte de los fragmentos elegidos y (b) purificación de los fragmentos.....	50
Figura 5.12. Secuencia de 685 pb del gen <i>baeN</i> presente en el genoma de <i>Bacillus</i> sp. 83 involucrado en la síntesis del antibiótico <i>bacillaene</i>	52
Figura 5.13. Alineamiento de la secuencia de la clona ERIC2W obtenida de la ligación del fragmento de 1700 pb de <i>Bacillus</i> sp. 83 con ERIC 1R/ERIC 2 con las más cercanas de <i>B. amyloliquefaciens</i>	54
Figura 5.14. Secuencia de la clona ERIC2W obtenida de la ligación del fragmento de 1700 pb con ERIC 1R/ERIC 2 y ubicación de los tres pares de oligonucleótidos diseñados.....	55
Figura 5.15. Alineamiento de la secuencia de 1678 pb de la clona ERN obtenida del fragmento de 1700 pb de <i>Bacillus</i> sp. 83 con ERIC-PCR, con las más cercanas de <i>B. amyloliquefaciens</i>	56

Figura 5.16. Secuencia de 1678 pb de la clona ERN obtenida de la ligación del fragmento de 1700 pb con ERIC-PCR y ubicación del par de oligonucleótidos diseñados CBam83F/CBam83R	58
Figura 5.17. Evaluación de la especificidad de los cuatro pares de marcadores diseñados para <i>Bacillus</i> sp. 83. (a) CBam83F/CBam83R, (b) ERIC2WA-f/ERIC2WA-r, (c) ERIC2WB-f/ERIC2WB-r y (d) ERIC2WC-f/ERIC2WC-r.....	61
Figura 5.18. Detección de la especificidad de los marcadores CBam83F/CBam83R con cepas de referencia de <i>Bacillus</i> y otros géneros bacterianos.	63
Figura 5.19. Detección de la especificidad de los marcadores CBam83F/CBam83R con cepas aisladas de Yucatán.....	63
Figura 5.20. Productos de amplificación del gen 16S rDNA de las cepas de referencia.....	64
Figura 5.21. Productos de amplificación del gen 16S rDNA de las cepas aisladas de Yucatán.....	64
Figura 5.22. Límite de detección de los marcadores CBam83F/CBam83R con DNA de <i>Bacillus</i> sp. 83 procedente de a) células de un cultivo puro y de b) células presentes en <i>Fungifree AB</i> [®]	65
Figura 5.23. Detección con los marcadores CBam83F/CBam83R, de células de <i>Bacillus</i> sp. 83 provenientes de un cultivo puro re-aisladas de hojas de papayo.....	66
Figura 5.24. Detección con los marcadores CBam83F/CBam83R, de células de <i>Bacillus</i> sp. 83 provenientes del formulado <i>Fungifree AB</i> [®] re-aisladas de hojas de papayo.....	67
Figura 9.2.1. Monitoreo del antagonismo de <i>Bacillus</i> sp. 83 contra a) <i>C. gloeosporioides</i> y b) <i>F. oxysporum</i>	79
Figura 9.3.1. Mapa del vector de clonación pTZ57R/T para los fragmentos correspondientes al genoma de <i>Bacillus</i> sp. 83	80
Figura 9.4.1. Análisis de transformantes con el inserto de la banda amplificada con BOX-A1R, RAPD OPG-11 y ERIC 1R/ ERIC 2	81
Figura 9.4.2. Purificación de plásmidos con el inserto de la banda amplificada con BOX-A1R, RAPD OPG-11 y ERIC 1R/ ERIC 2	82
Figura 9.5.1. Cepas de <i>Bacillus</i> que presentaron perfiles genómicos de a) RAPD, b) BOX y c) ERIC semejantes al agente de biocontrol <i>Bacillus</i> sp. 83	82
Figura 9.5.2. Cepas de <i>Bacillus</i> que presentaron la banda de 221 pb amplificada con los marcadores CBam83F/CBam83R.....	82

Índice de Tablas

Tabla 2.1. Ejemplos de formulaciones basadas en cepas de <i>Bacillus</i> para su uso en el control biológico.....	8
Tabla 2.2. Principales antibióticos producidos por especies del género <i>Bacillus</i>	11
Tabla 2.3. Métodos para identificar y cuantificar agentes de control biológico	16
Tabla 2.4. Características de los métodos, basados en ácidos nucleicos, más utilizados para el monitoreo de agentes de control biológico	18
Tabla 4.1. Cepas y plásmidos utilizados en el estudio	22
Tabla 4.2. Composición del medio YPG	25
Tabla 4.3. Composición del medio Luria (LB)	25
Tabla 4.4. Composición del medio PY + Ca ⁺²	25
Tabla 4.5. Soluciones y suplementos para purificación de DNA.....	25
Tabla 4.6. Suplementos usados en el medio LB para colonias transformantes	25
Tabla 4.7. Oligonucleótidos utilizados para la identificación molecular de <i>Bacillus</i> sp. 83	27
Tabla 4.8. Condiciones de PCR para amplificación del gen 16S rDNA	27
Tabla 4.9. Condiciones de PCR para amplificación del gen <i>recA</i>	27
Tabla 4.10. Oligonucleótidos utilizados para amplificar genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos	29
Tabla 4.11. Oligonucleótidos utilizados para los perfiles con RAPD, BOX y ERIC de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	30
Tabla 4.12. Condiciones de PCR para evaluar marcadores diseñados.....	33
Tabla 4.13. Condiciones de PCR para el marcador específico de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	34
Tabla 5.1. Cepas del género <i>Bacillus</i> aisladas de diferentes municipios del estado de Yucatán para evaluarlas con <i>Bacillus</i> sp. 83 mediante las técnicas rep-PCR y RAPD.....	40
Tabla 5.2. Identidad entre la secuencia nucleotídica del gen <i>recA</i> de <i>Bacillus</i> sp. 83 y otras bacterias	41
Tabla 5.3. Resumen de resultados del análisis de las clonas obtenidas a partir de la ligación de la banda de 1700 pb de <i>Bacillus</i> sp. 83 amplificada con OPG-11 (RAPD) que presentaron mayor similitud con genes de <i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 ^T	50
Tabla 5.4. Resumen de resultados del análisis de las clonas obtenidas a partir de la ligación del perfil genómico y de la banda de 250 pb de <i>Bacillus</i> sp. 83 amplificados con BOX-A1R que presentaron mayor similitud con genes de <i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 ^T	51
Tabla 5.5. Resumen de resultados del análisis de las clonas obtenidas a partir de la ligación de la banda de 1700 pb de <i>Bacillus</i> sp. 83 amplificada con ERIC 1R/ ERIC 2 que presentaron mayor similitud con dos especies de <i>B. amyloliquefaciens</i>	53
Tabla 5.6. Marcadores de secuencias caracterizadas diseñados para <i>Bacillus</i> sp. 83	59
Tabla 5.7. Análisis del BLASTN de la secuencia de 221 pb amplificada con los marcadores CBam83F/CBam83R en <i>Bacillus</i> sp. 83	61
Tabla 9.3.1. Oligonucleótidos utilizados en base al vector para el análisis de transformantes y secuenciación de fragmentos de <i>Bacillus</i> sp. 83.	80

Abreviaturas

Símbolo	Definición
ACB	Agente de control biológico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Cb	Carbenicilina
BOX	Secuencias de los elementos BOX
cv	Cultivar
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
ERIC	Secuencias consensos intergénicas repetidas de bacterias
h	Horas
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
Kb	Kilobases
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Polimorfismos del DNA amplificados al azar
RSI	Resistencia sistémica inducida
SCARs	Regiones amplificadas, secuenciadas y caracterizadas
V	Voltios
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil β -D galactopiranósido
16S rDNA	Gen que codifica para un RNA ribosomal
<i>recA</i>	Gen que codifica para la proteína RecA (recombinasa)
<i>ituD</i>	Gen que codifica para la enzima transacilasa putativa malonil coenzima-A que participa en la síntesis de iturina
<i>srfAA</i>	Gen que codifica para la enzima surfactina sintetasa
<i>mInA</i>	Gen que codifica para la enzima malonil aciltransferasa MInA participa en la síntesis de macrolactina
<i>baeN</i>	Gen que codifica para la proteína híbrida NRPS/PKS que participa en la síntesis de antibiótico <i>bacillaene</i>

Resumen

Las especies del género *Bacillus* se encuentran en suelos y asociadas a plantas. Algunas de sus integrantes son utilizadas como agentes de control biológico de enfermedades en diversos cultivos, gracias a la producción de moléculas biológicamente activas, como antibióticos, que inhiben el crecimiento de los fitopatógenos. La habilidad que tienen para producir esporas ha hecho de sus integrantes candidatos para el desarrollo de formulaciones que son aplicadas a nivel de campo en el control de enfermedades y plagas. Un reciente producto registrado como *Fungifree AB*[®], basado en el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83 es usado como alternativa para el control de enfermedades como la antracnosis.

En términos del gen ribosomal, la cepa 83 mostró 99 % de identidad con las secuencias publicadas de las cepas tipo *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T y *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T. Sin embargo, usando la secuencia del gen *recA*, la cepa 83 presentó 99 % de identidad con *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T y 85 % con *B. subtilis*. Haciendo uso de la reacción de PCR, se encontraron en el genoma del agente de biocontrol, los genes *srfAA*, *mlnA* y *bmyD* involucrados en la síntesis de los antibióticos surfactina, macrolactina A y bacilomicina D, respectivamente. La secuencia de 685 pb producida con BOX-PCR mostró 98 % de similitud con en el gen *baeN* de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T involucrado en la síntesis del antibiótico *bacillaene*.

Se desarrolló un marcador molecular para la identificación y posterior monitoreo del agente de biocontrol 83 cuando sea aplicado en el campo. Se usó la técnica de secuencias consensos de DNA intergénicas repetidas de enterobacterias (ERIC) para diferenciar al agente de control biológico del resto de los *Bacillus* spp. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1700 pb amplificado y discriminatorio de la cepa 83, que fue secuenciado y caracterizado para el diseño de marcadores de una región amplificada, caracterizada y secuenciada (SCAR). Se diseñaron cuatro pares de marcadores a partir de clonas de la ligación de este fragmento, los cuales fueron evaluados en una primera etapa con cepas de *B. amyloliquefaciens* para demostrar su especificidad. Los marcadores **CBam83F/CBam83R** fueron los únicos en demostrar especificidad para *Bacillus* sp. 83 en relación a otras bacterias. El límite de detección de los marcadores fue evaluado por PCR cualitativo, detectando hasta 3 pg μL^{-1} de DNA de células vegetativas. Los marcadores también demostraron capacidad para detectar la presencia del agente de biocontrol en hojas de papayo durante seis días, cuando se asperjaron 3.1×10^7 células vegetativas y durante once días, cuando se inocularon 1×10^7 esporas contenidas en un gramo de polvo *Fungifree AB*[®] por mL asperjado de la cepa 83, bajo condiciones de laboratorio. En este estudio se desarrolló un método rápido, específico y confiable para detectar a la cepa 83.

Abstract

Bacteria belonging to the genus *Bacillus* are common soil inhabitants and are closely associated to plants. Members of these bacilli have become good candidates as biocontrol agents, for the production of a vast array of biologically active molecules potentially inhibitory for phytopathogen growth. This feature has led to increased efforts to control plant diseases with biological products based on *Bacillus* species or their metabolites as alternative and ecofriendly method to chemicals. A newly registered biological control product *Fungifree AB*[®], based on the antagonist *Bacillus* sp. strain 83, has been used as alternative for mango anthracnose disease management. In this work, a strain-specific molecular marker to detect the strain in agricultural fields was developed.

The 16S rDNA sequence from strain 83 had 99 % identity with the sequence of *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T and *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T, while *recA* sequence scores of 99 % and 85 % were obtained for *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T and *B. subtilis*, respectively. Specific polymerase chain reaction primers identified this bacterium by the presence of the biosynthetic genes *srfAA*, *mInA*, *bmyD* of the antibiotics surfactin, macrolactin A and bacillomycin D, respectively. A sequence of fingerprinting patterns produced by the BOX technique showed the presence of the *baeN* gene, involved in the biosynthesis of the antibiotic bacillaene present in the 83 strain genome.

ERIC-PCR technique was used to differentiate the strain 83 from other *Bacillus* strains and to obtain fingerprinting patterns. This approach allowed the selection of a 1.7 kb differentially amplified fragment obtained from ERIC profiles. The fragment was cloned, sequenced and used to design four sequence characterized amplification region (SCAR) primers. They were evaluated for their specificity towards this strain. Only **CBam83F/CBam83R** primers were highly specific for strain 83. The sensibility of these primers was evaluated by classical polymerase chain reaction (PCR) with a series of 10 fold dilutions of strain 83 DNA; the lowest DNA concentration detected was 3 pg μL^{-1} . Strain 83 was specifically detected by the primers from the collected DNA mixture of microorganisms on leaves during 6 days when 3.1×10^7 vegetative cells were used, and for 11 days after 1×10^7 spores present in the product *Fungifree AB*[®] were sprayed. This study provided a fast, specific and reliable method to detect strain 83.

1. Introducción

Las enfermedades y plagas ocasionadas por hongos, bacterias, virus e insectos, llegan a provocar pérdidas hasta del 50 % del total de la producción en diversos cultivos agrícolas de importancia comercial, originándose desde el campo hasta la etapa de postcosecha y provocando la disminución de la calidad del producto, evitando su comercialización (El-Ghaouth, 1997).

El control de plagas y enfermedades se ha llevado a cabo en gran parte mediante la aplicación de productos químicos (Agrios, 2000). Sin embargo, el uso extensivo de estos compuestos, ha incrementado el nivel de contaminación en el suelo y en el agua, provocando efectos adversos en la calidad de los alimentos y en la salud de los seres humanos; además de generar organismos fitopatógenos altamente resistentes (Cook, 1993; Ibarra *et al.*, 2006). Las estrictas regulaciones sobre el uso de compuestos químicos para el control de fitopatógenos, la presión social para retirar del mercado los más dañinos y la creciente preocupación por parte de los consumidores de adquirir alimentos que estén libres de plaguicidas y fungicidas están haciendo inevitable la búsqueda de alternativas seguras y amigables con el medio ambiente y con los humanos.

La utilización de microorganismos en el control biológico de plagas y enfermedades en plantas ha sido considerada como un método alternativo, debido al reducido impacto ambiental que ha presentado. El control biológico es definido como “el uso de organismos y/o sus metabolitos o subproductos, que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de disminuir su población y reducir o eliminar los efectos dañinos que causan a la planta o sus productos” (Serrano-Carreón y Galindo, 2007).

En los últimos años, el control biológico de fitopatógenos ha demostrado ventajas sobre el químico, en cuanto a la especificidad antagónica en diferentes cultivos, por lo que ha sido tema de estudio en numerosos grupos de investigación. Se han identificado y evaluado varios microorganismos con potencial para actuar como agentes de control biológico destacándose: *Bacillus* spp. (Demoz y Korsten, 2006; Chen *et al.*, 2009a; Arguelles-Arias *et al.*, 2009; Arrebola *et al.*, 2010), *Pseudomonas* spp. (Pujol *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2008), *Candida* spp. (Gamagae *et al.*, 2003; Massart *et al.*, 2005), *Rhodotorula* spp. (Patiño-Vera *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009) y *Trichoderma* spp. (Hermosa *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2005).

Entre los mecanismos antagonistas que llevan a cabo los agentes de control biológico (ACB), destacan: la competencia por espacio y nutrientes entre el patógeno y el antagonista, parasitismo sobre el patógeno, producción de metabolitos secundarios (enzimas líticas capaces de destruir literalmente la pared celular del patógeno; y producción de antibióticos) y la inducción de resistencia sistémica contra el patógeno mediante

la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta. El agente de biocontrol a través de estos mecanismos y de su aplicación tanto en precosecha como en postcosecha, han sido útiles para controlar la actividad del patógeno en diversos cultivos, y de esa manera disminuir las pérdidas que se originan de las infecciones latentes provenientes del campo (Spadaro y Gullino, 2004).

Debido a la importancia que tiene la agricultura dedicada a productos de exportación en nuestro país, es importante que se desarrollen tecnologías para la producción, formulación y aplicación de los agentes de control biológico (ACB) de fitopatógenos. El desarrollo de tecnologías, inicia con la búsqueda y selección de un aislado microbiano eficaz para el control del crecimiento del patógeno. De manera paralela, debe desarrollarse un sistema de producción y formulación, para obtener un producto con una vida de anaquel alta y que provea al ACB ventajas competitivas en el ambiente en el cual será aplicado (Serrano-Carreón y Galindo, 2007). Es importante considerar que la tecnología de producción y formulación debe ofrecer un producto que reúna las cualidades necesarias para potenciar los mecanismos de antagonismo del agente de control biológico en su aplicación en el campo. Las cepas antagonistas seleccionadas deben de ser capaces de ejercer su control no sólo en el laboratorio, sino también bajo condiciones naturales en donde esté presente la enfermedad.

En la búsqueda de agentes de control biológico, el laboratorio del Dr. Enrique Galindo en colaboración con el CIAD-Culiacán aislaron de la filósfera de mango a la bacteria *Bacillus* sp. 83, la cual ha mostrado características importantes de actividad antagónica para ser utilizada como agente de biocontrol. Esta cepa resultó ser efectiva tanto en precosecha como en postcosecha de cultivos de mango en el control de la enfermedad denominada “antracnosis” ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005). Además se observó y demostró *in vitro* que su mecanismo de acción es a través de la producción de metabolitos termorresistentes con actividad antifúngica (Morales, 2007; Solís, 2010). Debido a las características señaladas, se desarrolló un formulado en polvo que contiene esporas de la cepa 83, denominado Fungifree AB®, para su uso comercial como agente de control biológico de enfermedades.

En el grupo existe el interés, además de conocer qué otros mecanismos utiliza *Bacillus* sp. 83 para el control de la antracnosis, también es necesario el conocimiento de su persistencia después de su aplicación sobre superficies vegetales. Algunos autores han mencionado la importancia de la colonización de las plantas por parte de los antagonistas, para que lleven a cabo los mecanismos de control sobre los patógenos. Los trabajos realizados en campo demostraron que la cepa 83 controló la enfermedad. Sin embargo, no se tuvo evidencia de su presencia y el tiempo en que ésta permaneció en las hojas de mango después de haber sido asperjada. Por tal motivo, en este trabajo de investigación, se propuso el desarrollo

de un método para la identificación de la cepa 83 presente en el formulado *Fungifree AB*[®] cuando sea aplicada en campo.

El desarrollo y aplicación del método para el seguimiento de un ACB debe proporcionar su identificación inequívoca con la finalidad de evaluar su colonización y dinámica de población; y por lo tanto que los resultados puedan utilizarse para optimizar su aplicación y lograr el mayor nivel de control posible de la enfermedad. El monitoreo de un ACB es un reto, debido a la complejidad y a la diversidad microbiana presente en el ambiente. Actualmente, son pocos los métodos de monitoreo que se han desarrollado para identificar y cuantificar, en muestras complejas como el suelo y las plantas, a los agentes de biocontrol. Se han reportado diferentes métodos que van desde los microbiológicos tradicionales hasta los moleculares que hacen uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para estos últimos, se han empleado las mismas estrategias y protocolos desarrollados para la detección y cuantificación de fitopatógenos. Además, este tipo de métodos hace posible la diferenciación del ACB de otros microorganismos cercanos y el entendimiento de su establecimiento donde es aplicado (Holmberg *et al.*, 2009).

2. Antecedentes

2.1. Control biológico de enfermedades

El uso desmedido de plaguicidas y fungicidas ha traído serios problemas ambientales y de salud, además de la resistencia de los patógenos y la revocación del registro de muchos fungicidas foliares, ha obligado a la búsqueda de alternativas para el control de enfermedades. Una de las estrategias con potencial para disminuir los problemas anteriores, es el uso de los antagonistas naturales de los fitopatógenos (Beattie y Lindow, 1999), los cuales han demostrado ser una de las alternativas seguras y amigables con el medio ambiente, en diversos cultivos de importancia agrícola en nuestro país.

Para seleccionar un microorganismo como agente de biocontrol, además de estudiar su poder inhibitorio, se deben tener en cuenta otras características entre las que destacan: estabilidad genética, efectivo a bajas concentraciones, habilidad para colonizar, capaz de sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, efectivo para un amplio rango de fitopatógenos en diferentes cultivos, ser compatible con otras prácticas agrícolas, no ser patógeno para el hospedero y principalmente no producir metabolitos dañinos para el ser humano (Janisiewicz y Korsten, 2002). Además de lo anterior, es importante para el control de la enfermedad, la relación entre la concentración aplicada del antagonista y la concentración presente del patógeno, así como también el tiempo transcurrido desde su aplicación y el efecto que tenga hacia el microorganismo causante de la enfermedad (Barkai-Golan, 2001).

Las investigaciones sobre el establecimiento de los agentes de biocontrol y su interacción con el hospedero y el patógeno, han ofrecido una nueva manera de entender el mecanismo de control de las enfermedades en las plantas. Los géneros que han presentado actividad antagónica contra fitopatógenos, han sido principalmente *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Candida* y *Trichoderma* (Kinkel, 1997).

2.2. Género *Bacillus* como agente de control biológico de enfermedades

Bacillus es uno de los géneros bacterianos mejor caracterizados. Es un género muy heterogéneo en cuanto a su fisiología, ecología y genética. Está formado por microorganismos bacilares, Gram-positivos, anaerobios o aerobios facultativos, nitrificantes, desnitrificantes, fijadores de nitrógeno, alcalófilos y acidófilos (Slepecky y Hemphill, 2006); producen formas celulares denominadas esporas en respuesta a estrés nutricional o ambiental. Estas formas celulares son metabólicamente inactivas hasta que puedan detectar nutrientes en el ambiente y responder a ellos, pasando al estado de célula vegetativa (Errington, 2003). Además de tener la capacidad de esporular, las especies de *Bacillus* tienen que desarrollar otro tipo de estrategias entre las que destacan la movilidad, quimiotaxis y producción de metabolitos (enzimas líticas,

sideróforos y antibióticos) para suprimir la competencia con los patógenos y con ello poner a su disposición los nutrientes del medio (Earl *et al.*, 2008).

Se han reportado diferentes maneras para clasificar este género de acuerdo a su bioquímica, estilos de vida y crecimiento en diferentes sustratos. Una de ellas, muy general, lo ha agrupado en tres categorías: patogénicos, ambientales y aquellos con potencial para usarse en la industria. Las especies dentro del grupo de los ambientales incluyen a *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. megaterium*, *B. halodurans* y *B. coahuilensis* (Alcaraz *et al.*, 2005). Miembros de este grupo son utilizados para el control de enfermedades y plagas gracias a su habilidad para la formación de esporas y la producción de metabolitos antibacterianos y antifúngicos (Lee *et al.*, 2006; Jamalizadeh *et al.*, 2009), por lo que se han desarrollado productos estables y eficientes para su uso a gran escala. Los productos basados en especies de *Bacillus* representan cerca de la mitad de los agentes de control biológico que se comercializan actualmente (Fravel, 2005; Ongena *et al.*, 2010) (**Tabla 2.1**).

La especie *B. subtilis* ha sido la más reportada como agente de biocontrol, gracias a la producción de una amplia variedad de metabolitos secundarios antimicrobianos (Ongena *et al.*, 2005) que le confieren control sobre diferentes fitopatógenos. Entre estos metabolitos destacan los antibióticos de las familias de las iturinas, surfactina, fengicinas, bacilomicinas y micosubtilina; volátiles para promover el crecimiento e inducir el sistema de defensa en las plantas para el control de patógenos. Se han evaluado diferentes cepas de esta especie en cultivos como tomate (Phae *et al.*, 1992), frijol de soya (Souto *et al.*, 2004), manzana (Leibinger *et al.*, 1997; Brogginini *et al.*, 2005), aguacate (Demoz y Korsten, 2006), mango (Balderas, 2004; Carrillo-Fasio *et al.*, 2005), chile (Guillén-Cruz *et al.*, 2006) y garbanzo (Rodríguez, 2005; Paredes *et al.*, 2008).

La cepa tipo DSM7^T de la especie *B. amyloliquefaciens* fue descubierta por primera vez por Fukumoto en 1943 (citado por Rückert *et al.*, 2011) y nombrada así por su capacidad para producir α -amilasa. En 1987 *B. amyloliquefaciens* fue reconocida como una especie distinta de *B. subtilis*, después de un gran debate con respecto a su posición taxonómica. Su separación de *B. subtilis* se basó principalmente en experimentos de hibridaciones DNA-DNA (demostrando sólo el 25 % de similitud con *B. subtilis*), además de estudios fisiológicos y bioquímicos entre ambas especies (Priest, 1987).

B. amyloliquefaciens ha demostrado potencial para el control de enfermedades en cítricos (Arrebola *et al.*, 2010), pepino, sandía, tomate y tabaco (Choudhary y Johri, 2009), chile (Guillén-Cruz *et al.*, 2006), mora (Kim y Chung, 2004) y en manzana (Touré *et al.*, 2004).

La cepa FZB42^T una de las más representativas de *B. amyloliquefaciens*, aislada de suelo infestado con patógenos de plantas; siendo la primera de esta especie en ser secuenciada, debido a su capacidad para la colonización de plantas y control de fitopatógenos. Se encontró que difiere de la cepa modelo *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T (primer genoma del género *Bacillus* secuenciado) por su habilidad para incrementar el crecimiento de las plantas y producir diversos metabolitos secundarios con actividad antibiótica, antifúngica y nematocida (Chen *et al.*, 2007; 2009b).

Tabla 2.1. Ejemplos de formulaciones basadas en cepas de *Bacillus* para su uso en el control biológico.

<i>Bacillus</i> antagonista	Patógeno	Producto	Compañía	Referencia
<i>B. subtilis</i> QST 713	<i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Rhizoctonia</i>	Serenade®	AgraQuest, California	Jacobsen <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> GB03	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Gossypium</i>	Kodiak®	Bayer Crop Science	Joshi, y McSpadden-Gardener, 2006
<i>B. subtilis</i> MBI600	<i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Rhizoctonia</i>	Subtilex®	Baker Underwood	Joshi, y McSpadden-Gardener, 2006
<i>B. subtilis</i> B2g	<i>Fusarium</i> y <i>Rhizoctonia</i>	Phytovit®	Prophyta GmbH, Alemania	Marten <i>et al.</i> , 2000
<i>B. subtilis</i> B246	Hongos patógenos del aguacate	Avogreen®	NZAGA, Nueva Zelanda	Demoz y Korsten, 2006
<i>B. subtilis</i> BD170	<i>Erwinia amylovora</i>	Biopro®	BioSystem GmbH, Alemania	Broggini <i>et al.</i> , 2005
<i>B. subtilis</i> FZB24	Biofertilizante, protección contra patógenos del suelo	FZB24® liquid Rhizo Plus® Taegro®	ABiTEP GmbH, Berlín, Alemania	Krebs <i>et al.</i> , 1998
<i>B. subtilis</i> CMB26	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Cladosporium fulvum</i>	POMEX	NN Co. Ltd Corea	Borriss, 2011
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	Biofertilizante, protección contra patógenos de suelo	RhizoVital®	ABiTEP GmbH, Berlín, Alemania	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>B. subtilis</i> GB122 y <i>B. amyloliquefaciens</i> GB99	<i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Rhizoctonia</i>	BioYield®	Bayer Crop Science	Fravel <i>et al.</i> , 2005
<i>B. licheniformis</i> SB3086	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	EcoGuard®	Novozymes	Fravel <i>et al.</i> , 2005
<i>B. pumilus</i> GB34	<i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Rhizoctonia</i>	Yield Shield®	Bayer Crop Science	Schisler <i>et al.</i> , 2004
<i>B. pumilus</i> QST2808	Hongo causal de la "cenicilla", <i>Erysiphe cichoracearum</i> .	SONATA®	AgraQuest, California	Borriss, 2011

2.2.1. Mecanismos de control de fitopatógenos por el género *Bacillus*

En el control de enfermedades, una de las mayores dificultades consiste en entender y estudiar las interacciones que tienen lugar entre el hospedero, el patógeno, el antagonista y otros microorganismos presentes en la zona.

Los antagonistas no tienen un único modo de acción y el control biológico es el resultado de diferentes tipos de interacciones entre los microorganismos (**Figura 2.1**), entre las que destacan, el antagonismo directo e indirecto. El antagonismo directo resulta de la interacción del agente de biocontrol con el patógeno, considerándose la competencia por espacio y nutrientes, y la antibiosis como las formas de antagonismo más directas. Por el contrario, el antagonismo indirecto, es el resultado de las actividades que no involucran la interacción física del agente de biocontrol con el patógeno; sino a través de la producción de ciertos metabolitos por parte de los agentes de biocontrol que activan los mecanismos de defensa de la planta hospedera, mediante el fenómeno conocido como resistencia sistémica inducida (Heydari y Pessarakli, 2010).

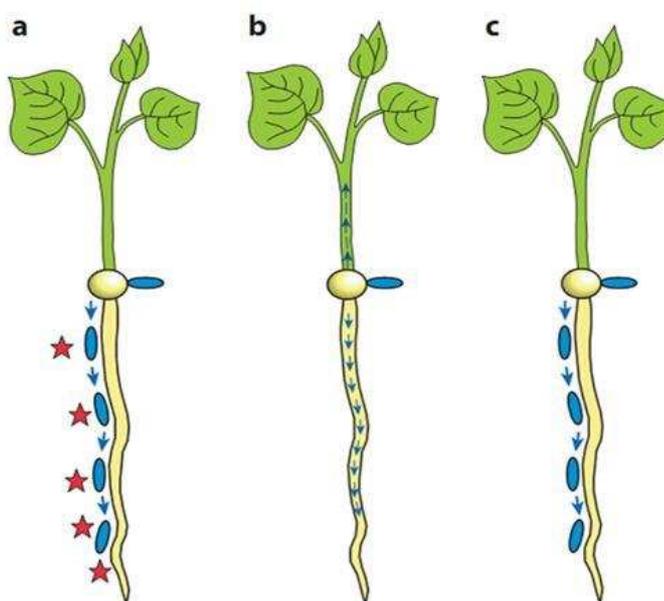


Figura 2.1. Mecanismos más importantes para el control biológico de enfermedades de plantas mediados por bacterias. a) Antibiosis. Las bacterias colonizan las raíces y producen compuestos antibióticos contra los patógenos (representados por estrellas) que se dirigen a las raíces. b) Resistencia sistémica inducida (RSI). La colonización local de las raíces es suficiente para inducir la RSI en plantas. Muchos metabolitos bacterianos inducen el sistema de señales sistémicas en la planta, que la protegen contra enfermedades causadas por diferentes patógenos. c) Competencia por espacio y nutrientes. Las bacterias actúan mediante un movimiento rápido por quimiotaxis en la superficie de las raíces, con la finalidad de llegar a los exudados producidos por las raíces y por lo tanto competir con el patógeno por los nutrientes y el nicho (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

2.2.1.1. Control mediado por antibiosis

La inhibición del patógeno mediada por antibiosis es muy común en la naturaleza. Algunas especies del género *Bacillus* son consideradas “fábricas microbiológicas” (Ongena y Jacques, 2007) dado a su capacidad para producir moléculas biológicamente activas como antibióticos, con potencial inhibitorio para el crecimiento de un amplio rango de fitopatógenos (**Tabla 2.2**). Estos metabolitos son altamente resistentes a la hidrólisis por proteasas y peptidasas, son de naturaleza anfipática, por lo que se ubican anclados fuertemente en la bicapa lipídica y por ello, pueden interferir en la integridad de las membranas biológicas de los patógenos (Ongena y Jacques, 2007). Los antibióticos pueden ser sintetizados de forma ribosomal como son subtilina, subtilosina A, sublancina y ericina S; o por vía no ribosomal sintetizando pequeños lipopéptidos pertenecientes a la familia de la surfactina: surfactina y liquenisinas; familia de las iturinas: iturina A, C, D y E, bacilomicina D, F y L, y micosubtilina; y la familia de las fengicinas: fengicinas y plipastatínas (Stein, 2005; Athukorala *et al.*; 2009).

Algunos autores como Asaka y Shoda (1996) han estudiado el modo de acción y evaluación de la eficacia *in vitro* de lipopéptidos antibióticos (iturina A y surfactina) producidos por especies como *B. subtilis* (cepa RB14) para el control de *Rhizoctonia solani* y disminuir las pérdidas en tomate. Posteriormente, bajo condiciones de invernadero, se demostró una vez más que la acción de estos lipopéptidos fue benéfica para controlar la podredumbre de las semillas de tomate.

Krebs *et al.*, (1998) demostraron en ensayos *in vitro*, la actividad antifúngica de siete cepas de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, contra 16 hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en las raíces. Bajo condiciones ricas en nutrientes, la cepa FZB24 mostró una comparable actividad con las cepas FZB13, FZB44, FZB47 y *B. subtilis* GB03 (aislado del producto comercial *Kodiak*TM); sin embargo, la cepa que mostró la más alta actividad fue FZB42. Por el contrario, FZB37 y FZB38 exhibieron las más bajas actividades antifúngicas, bajo las mismas condiciones.

Los lipopéptidos iturina, fengicina y surfactina producidos por *B. subtilis* GA1, de acuerdo a lo reportado por Touré *et al.*, (2004), redujeron el 80 % de la enfermedad del moho gris en la manzana, causada por *Botrytis cinerea*, al aplicarse en la superficie de los frutos una suspensión de esporas de la bacteria antagonista.

Souto *et al.*, (2004) evaluaron la producción simultánea de surfactina e iturina A por una cepa de *Bacillus* sp. BNM122 (relacionada genéticamente a *B. amyloliquefaciens*), encontrando un efecto sinérgico entre estos dos lipopéptidos para controlar la población de *R. solani* causante de pérdidas en el cultivo de soya.

Tabla 2.2. Principales antibióticos producidos por especies del género *Bacillus*.

<i>Bacillus</i> antagonista	Antibiótico	Patógeno	Referencia
<i>B. subtilis</i> RB14	Iturina y Surfactina	<i>R. solani</i>	Asaka y Shoda, 1996
<i>B. subtilis</i> M4	Fengicina	<i>P. ultimum</i>	Ongena <i>et al.</i> , 2005
<i>B. subtilis</i> QST713	Iturina A	<i>B. cinerea</i> y <i>R. solani</i>	Kloepper <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> BBG100	Micosubtilina	<i>P. aphanidermatum</i>	Leclère <i>et al.</i> , 2005
<i>B. subtilis</i> ME488	Iturina, Bacilisina, Bacilomicina D, Mersacidina y Micosubtilina	<i>F. oxysporum</i> y <i>Phytophthora capsici</i>	Kim y Chung, 2004
<i>B. subtilis</i> GA1	Fengicina e Iturina	<i>B. cinerea</i>	Touré <i>et al.</i> , 2004
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	Surfactina, Bacilomicina D, Fengicina, Macrolactina, Dificidina y Bacillaene	<i>F. oxysporum</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>B. amyloliquefaciens</i> PPCB004	Iturina A	<i>C. gloeosporioides</i> , <i>Alternaria citri</i> y <i>Botryosphaeria</i> sp.	Arrebola <i>et al.</i> , 2010
<i>B. amyloliquefaciens</i> GA1	Iturina A, Surfactina y Fengicina	<i>B. cinerea</i>	Arguelles-Arias <i>et al.</i> , 2009
<i>B. amyloliquefaciens</i> RC-2	Iturina A	<i>C. dematium</i>	Yoshida <i>et al.</i> , 2001

El trabajo desarrollado por Joshi y McSpadden-Gardener (2006) fue uno de los primeros en demostrar la relación entre la producción de compuestos antibióticos por cepas de *B. subtilis* presentes en formulados comerciales y el control de fitopatógenos. Se identificaron marcadores genéticos basados en los genes involucrados en la síntesis de antibióticos como bacilomicina, fengicina, iturina y surfactina (*bmyB*, *fenD*, *ituC*, *srfAA*, y *srfAB*). Los genes fueron amplificados en *B. subtilis* GB03 (*Kodiak*®, Gustafson Biologicals), *B. subtilis* QST713 (*Serenade*® Agraquest Inc., Davis, CA) y *B. subtilis* MBI600 (*Subtilex*®, Becker Underwood). Cada una de las secuencias de estos genes fue comparada con el genoma disponible de *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T, encontrándose diferencias con los genes de las especies evaluadas y su relación con el biocontrol. Un año más tarde (2007), las secuencias de los genes anteriores fueron comparadas con el nuevo genoma disponible de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T, encontrándose que las cepas que componen los formulados comerciales, comparten múltiples elementos genéticos con la cepa FZB42^T, responsables de la efectividad para el control de fitopatógenos (citado por Borriss, 2011).

2.2.1.2. Competencia por espacio y/o nutrientes

Los antagonistas que presentan el modo de competencia de nutrientes o espacio, generalmente están mejor adaptados que los patógenos a las condiciones adversas del medio. El antagonista debe demostrar un

rápido crecimiento, ser capaz de utilizar nutrientes a bajas concentraciones, sobrevivir y desarrollarse en las superficies de las plantas bajo condiciones que no sean favorables para el patógeno.

La competencia en la rizósfera o en las partes aéreas de las plantas está vinculada con la capacidad que tiene el antagonista para formar comunidades altamente estructuradas, sésiles y que presenten resistencia antimicrobiana. Las poblaciones microbianas asociadas a plantas, se organizan en comunidades llamadas *biofilms* (ubicadas en superficies sólidas) o películas (ubicadas en superficies líquidas), gracias a la producción de exopolisácaridos que les permiten adherirse y sobrevivir a diferentes superficies vegetales (Ongena *et al.*, 2010).

Algunos estudios han revelado la participación de los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* a diferentes niveles en la red compleja vinculada con la movilidad, formación de *biofilms* y de cuerpos fructíferos para la colonización de las plantas. Bais *et al.*, (2004) demostraron que la participación del lipopéptido surfactina producido por *B. subtilis* 6051 es esencial para la colonización de las raíces de *Arabidopsis* spp., además de jugar un papel importante en el mecanismo de biocontrol contra el fitopatógeno *Pseudomonas syringae*.

Leclère, *et al.*, (2005) encontraron que una baja tensión superficial lograda por la sobreproducción del surfactante micosubtilina, es suficiente para que el antagonista logre la colonización de las raíces del tomate.

2.2.1.3. Resistencia sistémica inducida en plantas (RSI)

Durante la interacción entre el agente de biocontrol y la planta, se han observado procesos de desarrollo de resistencia sistémica en el hospedero. Se ha documentado que algunas especies de *Bacillus* (conocidas como rizobacterias promotoras de crecimiento) producen compuestos que afectan positivamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también pueden desencadenar una serie de reacciones de defensa en la planta hospedera (Kloepper *et al.*, 2004).

Los metabolitos secundarios como lipopéptidos y/o compuestos orgánicos volátiles (ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, entre otros) producidos por los antagonistas pueden inducir el sistema de resistencia en las plantas. La resistencia sistémica inducida (RSI) es una respuesta de defensa de la planta ante la presencia y actividad de un agente de control biológico específico, que reduce la severidad, la incidencia de la enfermedad o el daño causado por un patógeno que se encuentra separado espacialmente del agente inductor (Kloepper *et al.*, 2004).

Se ha demostrado la participación de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. sphaericus* y *B. pasteurii* como inductores de resistencia en plantas a través de ensayos en invernadero y en campo, en cultivos de tomate, sandía, pepino y *Arabidopsis* (Choudhary y Johri, 2009).

Ryu *et al.*, (2004) evaluaron la participación de *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a en la promoción del crecimiento y en la inducción del sistema de resistencia en plantas de *A. thaliana*. Los resultados mostraron que la exposición de las plantas a los compuestos orgánicos volátiles como 2,3-butanoidol y acetoína producidos por los antagonistas, redujeron significativamente la severidad de la enfermedad en las plántulas causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (antes *Erwinia carotovora*). La exposición durante cuatro días fue suficiente para activar la resistencia sistémica en las plántulas. Este estudio reveló por primera vez la participación de compuestos volátiles producidos por miembros del género *Bacillus*, como iniciadores para la activación del sistema de defensa de las plantas.

En otros reportes, Ongena *et al.*, (2005) demostraron el potencial de *B. subtilis* M4 para proteger a la planta de frijol de enfermedades fúngicas causadas por *Pythium ultimum*, a través de la producción de los lipopéptidos tipo fengicinas y surfactinas, metabolitos activos involucrados en el biocontrol de manera indirecta a través de la inducción del sistema de defensa de la planta.

2.3. *Bacillus* sp. 83 como agente de control biológico

2.3.1. Antracnosis

Colletotrichum comprende un amplio grupo de hongos fitopatógenos involucrados en enfermedades como la antracnosis, causando pérdidas en pre y postcosecha en varios cultivos tropicales y subtropicales, como el mango (Akem, 2006; Huerta-Palacios *et al.*, 2009), papaya (Tapia-Tussell *et al.*, 2009) y fresa (Garrido *et al.*, 2009), sólo por citar algunos. Las especies patógenas encontradas en los cultivos citados, han sido *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*. Las infecciones usualmente son iniciadas en el campo donde el patógeno sobrevive por largos períodos de tiempo en el suelo y en desechos vegetales, hasta dispersar sus conidios a través del agua y el viento, para adherirse a la superficie del siguiente hospedero y germinar en un período de 12 a 24 h hasta producir un tubo germinal que penetra directamente en la cutícula de la planta; ya sea a través de aberturas naturales del hospedero (como estomas y lenticelas), por penetración directa y/o a través de heridas existentes en el hospedero (Adaskaveg y Hartin, 1997).

El tratamiento convencional de la enfermedad ha sido la aplicación intensiva de fungicidas químicos, desde el inicio de la floración hasta el amarre de frutos, teniendo como objetivo eliminar estructuras

reproductivas de los hongos y con ello evitar el establecimiento de la infección. La desventaja de su uso, son los residuos que permanecen aún después de la aplicación, llegando a ser tóxicos tanto para el ambiente como para los seres humanos; además de ocasionar el desarrollo de resistencia en los patógenos (Agris, 2000).

2.3.2. *Bacillus* sp. 83 antagonista de *C. gloeosporioides*

El control de fitopatógenos es de gran importancia, razón por la cual el Instituto de Biotecnología de la UNAM en colaboración con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Unidad Culiacán, unieron conocimientos y esfuerzos para buscar antagonistas naturales de *C. gloeosporioides* y desarrollar una tecnología a nivel piloto para la producción de un formulado en polvo efectivo para el control de la enfermedad (Galindo *et al.*, 2005). Se aisló de la filósfera de mango y se seleccionó a *Bacillus* sp. 83 entre un número amplio de cepas, por presentar el mayor potencial de inhibición del patógeno bajo condiciones *in vitro*.

Carrillo-Fasio *et al.*, (2005) reportaron las primeras pruebas de campo donde evaluaron el efecto de la aplicación sólo de *Bacillus* sp. 83, de una levadura *Rhodotorula minuta* y la combinación de ambos en árboles de mango (cv. Kent) para el control postcosecha de antracnosis. Compararon el efecto de los microorganismos en el desarrollo de la enfermedad contra los fungicidas químicos; encontrando que los biofungicidas son tan buenos o mejores en el control de antracnosis, que el fungicida comercial benomilo.

Del año 2006 al 2008 se llevaron a cabo evaluaciones a nivel semi-comercial con el agente de biocontrol en huertos de mango (cv Kent) con calidad de exportación de la región “El Rosario” Sinaloa. Se realizaron aplicaciones foliares mensuales desde la floración hasta la cosecha. Los mejores resultados se lograron cuando se aplicaron las dosis de 2 y 3 g de producto seco por litro de agua (para llevar a cabo la fumigación), con las cuales la efectividad biológica (medida en términos de ausencia de síntomas de la enfermedad en los frutos evaluados) fue del 83 y 80 %.

A finales del 2008, se inició el trámite de registro del biofungicida de *Bacillus* sp. 83 ante la SAGARPA para lo cual, fue un requisito obtener el dictamen de efectividad biológica con pruebas de campo verificadas por la misma SAGARPA, lo cual se llevó a cabo durante el ciclo agrícola del 2009 (Serrano-Carreón *et al.*, 2010). Actualmente, se cuenta con el formulado en polvo denominado *Fungifree AB*[®], basado en las esporas de *Bacillus* sp. 83 (1×10^9 esporas por gramo de polvo del producto).

2.4. Seguimiento de agentes de control biológico

El uso de microorganismos se ha ido incrementando para disminuir la aplicación de productos químicos en el control de patógenos de plantas. Aunque muchas bacterias son naturalmente capaces de llevar a cabo este tipo de funciones en el ambiente, las posibilidades para que su aplicación como agente de biocontrol a nivel de campo sea exitosa, aún son limitadas, ya que no siempre el número de células aplicadas, el tipo de formulación en el que se encuentra el agente de biocontrol o el método de aplicación, son los adecuados para que el microorganismo pueda adaptarse a las condiciones impuestas por el ambiente, por el hospedero y por los microorganismos endémicos. Para conocer de qué forma alteran estos factores a la colonización de los agentes de biocontrol, se requiere del conocimiento de su dinámica de población y relacionar este proceso con el control de la actividad patogénica.

En años recientes, varios estudios se han enfocado en conocer aspectos como la interacción de los microorganismos no modificados genéticamente, aplicados como agentes de control biológico, con la microbiota endémica en la capacidad para colonizar y sobrevivir a los diferentes ambientes, para lo cual ha habido interés en desarrollar técnicas que permitan la detección específica de las cepas usadas como ACBs, en presencia (en el campo) de una amplia diversidad de microorganismos, incluso de la misma especie que el ACB. La aplicación de un método para su detección específica proporciona una idea parcial de la ecología que sigue el agente de biocontrol (Van Veen *et al.*, 1997; Van Elsas *et al.*, 1998). En la **Tabla 2.3** se mencionan los principales métodos usados para el seguimiento de agentes de biocontrol.

2.4.1. Métodos microbiológicos y directos

La técnica que hace uso de la microbiología es la más utilizada gracias a su fácil manejo y bajo costo, para estimar el tamaño de la población de los agentes de control biológico mediante el conteo de sus colonias (UFC o NMP). Los **métodos microbiológicos** se basan en cultivar al microorganismo antagonista en un medio sólido. Este tipo de métodos hacen uso de las características naturales del agente de biocontrol, como la producción de algún metabolito, morfología (Lima *et al.*, 2003), resistencia a algún antibiótico (Mercier y Lindow, 2000) y utilización de nutrientes específicos para su crecimiento (Williamson *et al.*, 2008). Sin embargo, tienen la desventaja de ser extremadamente laboriosos y con limitaciones para identificar a nivel de especie y de cepa, además de identificar únicamente células cultivables (Van Elsas *et al.*, 1998). Algunos trabajos como los de Collins *et al.*, (2003), Pujol *et al.*, (2005) y Demoz y Korsten, (2006) han incluido este tipo de métodos para el monitoreo de agentes de control biológico.

Por otra parte, se encuentran los **métodos directos**, basados en la detección de una característica fenotípica del agente de biocontrol, como puede ser la emisión de fluorescencia, para lograr su

identificación sin la necesidad de cultivarlo (Pujol *et al.*, 2005). La cuantificación de la población de los agentes de biocontrol en el monitoreo directo, es lograda por métodos ópticos de detección como son la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo.

Tabla 2.3. Métodos para identificar y cuantificar agentes de control biológico.

Especie	Cepa	Detección	Cuantificación	Referencia
Bacterias				
<i>P. fluorescens</i>	phID ⁺	resistencia a antibióticos, rep-PCR (BOX)	Conteo de UFC y NMP	Landa <i>et al.</i> , 2002
<i>P. fluorescens</i>	EPS62e	RAPD, SCAR	Conteo de UFC	Pujol <i>et al.</i> , 2005
<i>P. brassicacearum</i>	MA250	RAPD, SCAR	Q-PCR	Holmberg <i>et al.</i> , 2009
<i>B. subtilis</i>	BD170	PCR con oligonucleótidos específicos	Conteo de UFC	Broggini <i>et al.</i> , 2005
<i>B. subtilis</i>	101	RAPD, SCAR	Conteo de UFC	Felici <i>et al.</i> , 2008
<i>B. cereus</i>	TS02	RAPD, SCAR	No determinaron cantidad de células	Chen <i>et al.</i> , 2010
Levaduras				
<i>Aureobasidium pullulans</i>	L47	RAPD, SCAR	PCR con fluorescencia	Schena <i>et al.</i> , 2002
<i>A. pullulans</i>	LS30	Microbiológico y AFLP	Conteo de UFC	Lima <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhodotorula glutinis</i>	LS11	Microbiológico y AFLP	Conteo de UFC	Lima <i>et al.</i> , 2003
<i>Candida oleophila</i>	O	SCAR	PCR tiempo real	Massart <i>et al.</i> , 2005
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	380408	Secuencias ITS	PCR tiempo real	Atkins <i>et al.</i> , 2003
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	RESP11	Secuencias ITS	PCR tiempo real Conteo de UFC	Atkins <i>et al.</i> , 2005
<i>Clonostachys rosea</i>	GR5	UP-PCR	PCR cualitativo	Bulat <i>et al.</i> , 2000
Hongos				
<i>Trichoderma atroviride</i>	11	RAPD, SCAR	PCR cualitativo	Hermosa <i>et al.</i> , 2001
<i>T. atroviride</i>	T1	RAPD, SCAR	PCR tiempo real	Codier <i>et al.</i> , 2007
<i>T. harzianum</i>	2413	RAPD, SCAR	PCR tiempo real	Rubio <i>et al.</i> , 2005
<i>F. oxysporum</i>	Fo47	ERIC-PCR, SCAR	PCR tiempo real	Edel-Hermann <i>et al.</i> , 2011

La **bioluminiscencia** (técnica basada en la fluorescencia) es una característica fenotípica que puede ser utilizada para marcar un agente de biocontrol y detectarlo *in situ*. Esta técnica está basada en la introducción de un gen exógeno reportero que codifica para enzimas o proteínas responsables de la

bioluminiscencia. Los genes reporteros más descritos y utilizados han sido el gen *lux* de la bacteria *Vibrio fischeri* y el gen *gfp* producida por la medusa *Aequorea victoria* que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. El gen *lux* codifica para la enzima luciferasa, y el gen *gfp* codifica para la proteína verde fluorescente. El gen *gfp* fue introducido en el genoma del agente de biocontrol *P. fluorescens* A506 para monitorearlo en el control de la enfermedad del “fuego bacteriano” (Tombolini *et al.*, 1997). La desventaja de usar esta técnica, es la introducción de un marcador genético exógeno (como un gen de resistencia a cierto tipo de antibiótico) que convierte al agente de biocontrol en un microorganismo genéticamente modificado (OGM). La liberación de éstos está restringida en campo, debido a la falta de conocimiento de los posibles efectos que puedan originar al ambiente y a la salud de los seres humanos, asociado a su uso a gran escala (Van Elsas *et al.*, 1998). Adicionalmente, si este gen no ofrece ninguna ventaja selectiva a la población bacteriana, tenderá a desaparecer o a no expresarse evitando la carga genética que conlleva su expresión.

2.4.2. Métodos moleculares

En los últimos años se han implementado varios métodos basados en el análisis de los ácidos nucleicos presentes en muestras provenientes del ambiente, como resultado del interés por detectar no sólo a los microorganismos que lo integran, sino también a los genes de esos microorganismos.

La detección inequívoca de los agentes de biocontrol dependerá de una o más características presentes en su genoma, que posteriormente será el o los marcadores que los identifiquen de la microbiota endémica presente en el ambiente donde son inoculados. Los marcadores pueden ser secuencias variables de los genes del 16S o 23S rDNA, secuencias de genes únicos involucrados en la producción o resistencia a ciertos antibióticos (Broggini *et al.*, 2005) y/o secuencias de genes únicos. La razón para seleccionar marcadores a nivel del DNA, no sólo es por la estabilidad de la molécula, sino también por lo útil que es como indicador del número de células inoculadas y también del gen o genes de esas células (Van Elsas *et al.*, 1998). La **Tabla 2.4** muestra las características de los métodos basados en ácidos nucleicos más usados para el monitoreo de agentes de biocontrol.

Existen técnicas útiles que detectan polimorfismos naturales dentro del genoma de los agentes de control biológico con el fin de obtener el marcador molecular específico. Algunas de las más citadas en la literatura son: polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (**AFLP** del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*), amplificación de secuencias repetidas basadas en PCR (**rep-PCR**) y polimorfismos del DNA amplificado al azar (**RAPD** del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*).

Tabla 2.4. Características de los métodos, basados en ácidos nucleicos, más utilizados para el monitoreo de agentes de control biológico.

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
AFLP	Digestión parcial del DNA con enzimas de restricción. Amplificación selectiva de los fragmentos digeridos con las enzimas.	Método altamente sensible y reproducible. Rápido escaneo de los polimorfismos presentes en el genoma. Genera información por el alto número de bandas. No genera falsos positivos.	Genera grandes cantidades de información, por lo que es necesario análisis asistido por computadora. Su uso es técnicamente demandante en el laboratorio.	Tipificación bacteriana y de eucariotes. Identificación a nivel de especie y de cepas. Genética de poblaciones.
RAPD	Amplifica secuencias al azar en el genoma. Usa oligonucleótidos cortos (10 bases). Temperatura de hibridación baja (40°C)	Genera gran número de fragmentos. No se requiere información previa del genoma. Se requieren pocas cantidades de DNA.	Baja reproducibilidad. Carece de un conocimiento <i>a priori</i> de la identidad de los productos amplificados	Diversidad genética. Identificación a nivel de especie y de cepas. Mapeo de genomas. Identificación de fitopatógenos.
BOX	Amplifica elementos repetidos de 154 pares de bases en el genoma bacteriano o fúngico.	Amplifica regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma. Discrimina cepas aisladas. Perfiles reproducibles.	Genera alto número de bandas por lo que requiere de la asistencia de sistemas de cómputo para comparar los patrones.	Estudio de poblaciones bacterianas. Descripción de nuevas especies. Identificación de fitopatógenos.
ERIC	Amplifica elementos repetidos intergénicos de 127 pares de bases en el genoma bacteriano o fúngico.	No requiere el uso de enzimas de restricción. Técnica reproducible. Alto poder de discriminación entre especies y cepas.	En presencia de contaminantes en la preparación de la mezcla de reacción, los perfiles generados pueden ser falsos positivos.	Relación entre bacterias. Tipificación bacteriana. Identificación de fitopatógenos.

La técnica de **AFLP** se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de DNA obtenidos mediante digestión con enzimas de restricción (Vos *et al.*, 1995). Combina la especificidad proporcionada por la digestión con enzimas que reconocen secuencias específicas del genoma, con la rapidez y facilidad de detección de polimorfismos mediante amplificación por PCR. La amplificación es específica y reproducible al usar oligonucleótidos complementarios a la secuencia de los adaptadores que se ligan a los extremos de los fragmentos de DNA digeridos. La presencia o ausencia de cada banda obtenida genera un código de barras o patrón que es específico para cada muestra analizada. Esta técnica ha sido usada principalmente para agentes de biocontrol eucariontes (Lima *et al.*, 2003; Buhariwalla *et al.*, 2005).

En cuanto a la técnica **rep-PCR**, ésta hace uso de oligonucleótidos complementarios a secuencias repetidas del DNA que están altamente conservadas en cada microorganismo. Esta técnica ha sido reportada como altamente reproducible, confiable, discriminatoria y rápida (Versalovic *et al.*, 1991; Louws *et al.*, 1994). Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas, incluyendo a las secuencias palindrómicas (de 35 a 40 pb) extragénicas repetidas (**REP** del inglés *Repetitive Extragenic Palindromic*), secuencias consensos (de 127 a 127 pb) intergénicas repetidas de enterobacterias (**ERIC** del inglés *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y secuencias (154 pb) de elementos **BOX**. Estas secuencias

parecen estar localizadas en distintas posiciones intérgenicas del genoma. Los elementos repetidos pueden estar presentes en ambas orientaciones del genoma y los oligonucleótidos se diseñan para iniciar la síntesis de DNA fuera de las secuencias repetidas invertidas en **REP**, **ERIC** y de la subunidad boxA de **BOX**; en la reacción de PCR. El uso de los oligonucleótidos en la reacción de PCR, proporcionan una amplificación selectiva de distintas regiones genómicas localizadas entre **REP**, **ERIC** o **BOX**. Los elementos repetidos producen un perfil genómico único del microorganismo de biocontrol, permitiendo la discriminación entre especies, subespecies y cepas (Versalovic *et al.*, 1991; Rademaker y de Bruijn, 1997).

RAPD es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en 1990. Se usa una colección de oligonucleótidos cortos (10 bases) para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar en el genoma del microorganismo. La baja temperatura de alineamiento (36°C) y el tamaño del oligonucleótido aseguran la hibridación con secuencias en el genoma para conseguir amplificar diversos fragmentos de DNA. Estos fragmentos se separan en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos microorganismos y proporcionan una huella genómica característica (Williams *et al.*, 1990).

Con la finalidad de simplificar las técnicas **AFLP**, **ERIC**, **RAPD** y **BOX** para detectar huellas genómicas de los agentes de control biológico y de reducir los tiempos de un cultivo previo, los métodos descritos pueden ser útiles para usar regiones amplificadas, secuenciarlas y caracterizarlas para finalmente obtener el marcador específico **SCAR** (**SCAR** del inglés *Sequence Characterized Amplified Regions*). Esta técnica, desarrollada en 1993, utiliza los fragmentos de DNA que fueron amplificados mediante ERIC, RAPD o BOX, los cuales se clonan y secuencian para diseñar oligonucleótidos específicos que permiten diferenciar al microorganismo biocontrol (Paran y Michelmore, 1993). Este tipo de marcadores **SCAR** han sido desarrollados para diversos agentes de control biológico y bacterias promotoras de crecimiento, usándolos como sondas específicas que hibridan con la secuencia única de su genoma, a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Sigler *et al.*, 2001; Hermosa *et al.*, 2001; Pujol *et al.*, 2005; Pujol *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010).

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

Las técnicas moleculares rep-PCR y RAPD, basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, son capaces de detectar polimorfismos dentro del genoma de la bacteria antagonista *Bacillus* sp. 83 y permitir el diseño de un marcador específico para su seguimiento en el campo.

3.2. Objetivos

3.2.1. General

Desarrollar un método de identificación molecular para el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83 basado en el diagnóstico de su perfil genómico por PCR, para distinguirlo de otras cepas similares al ser asperjado en campo.

3.2.2. Específicos

- Identificación molecular de *Bacillus* sp. 83.
- Identificar en el genoma de *Bacillus* sp. 83 genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos.
- Discriminar, a través del análisis de perfiles genómicos, a *Bacillus* sp. 83 de otras especies del género *Bacillus* cercanos filogenéticamente.
- Desarrollar un método de monitoreo molecular basado en PCR que identifique de forma específica a *Bacillus* sp. 83.
- Determinar la especificidad de los marcadores moleculares diseñados para *Bacillus* sp. 83.
- Determinar el límite de detección de los marcadores moleculares para *Bacillus* sp. 83.

4. Materiales y Métodos

4.1. Estrategia experimental

Se desarrolló una metodología que permitiera identificar de una forma específica al agente de control biológico *Bacillus* sp. 83. Para cumplir este objetivo, se utilizó la estrategia experimental ilustrada en la Figura 4.1.

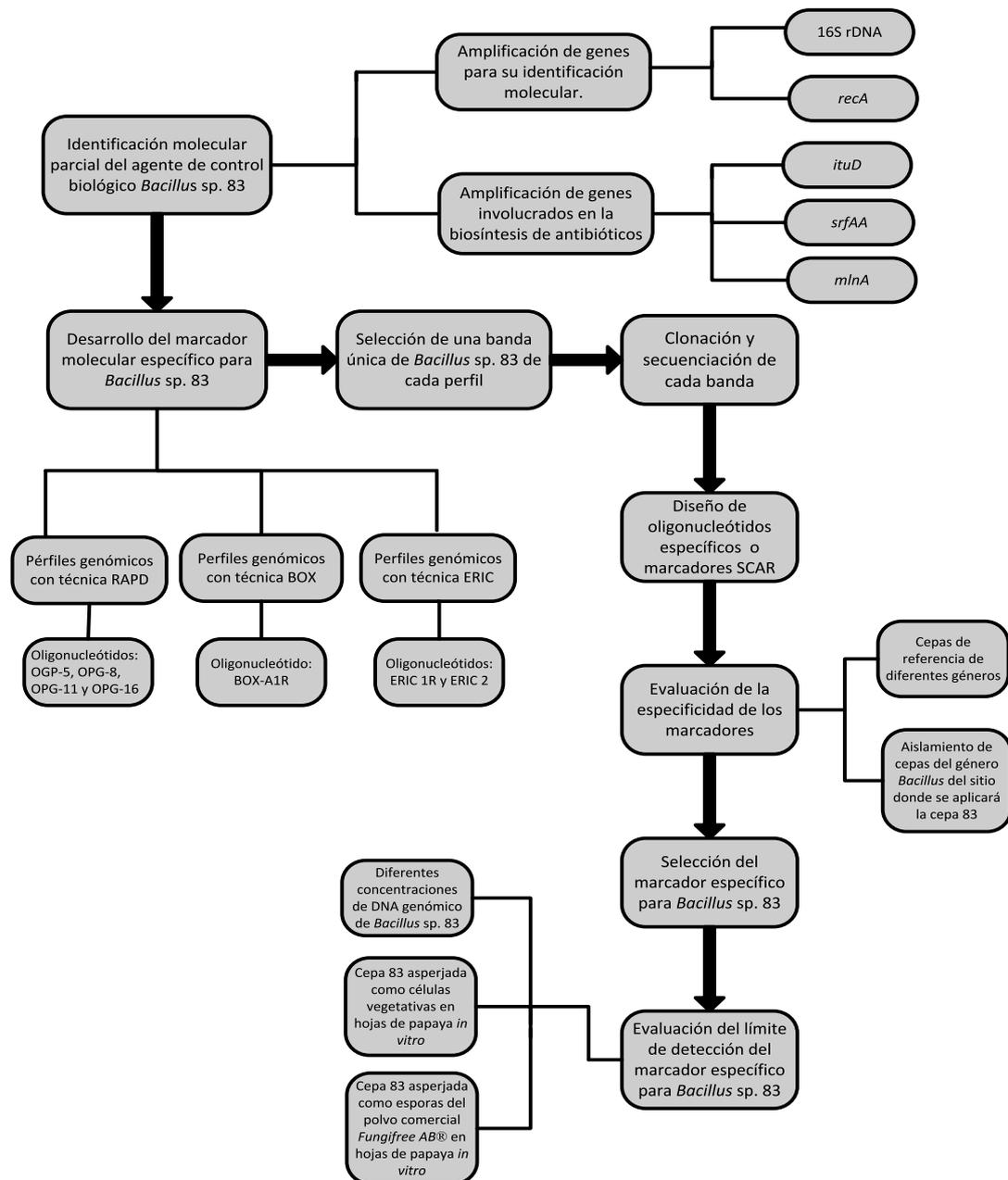


Figura 4.1. Esquema de la estrategia general del presente trabajo.

4.2. Cepas y Plásmidos

Las cepas de referencia (bacterianas y fúngicas) y los plásmidos utilizados durante esta tesis se detallan en la **Tabla 4.1**, junto con sus principales características.

Tabla 4.1. Cepas y plásmidos utilizados en el estudio.

Especie	Cepa	Referencia/Fuente
<i>B. subtilis</i>	6051	ATCC* Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	11774	ATCC* Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	6633	ATCC* Lab. Ecología Genómica, CCG-UNAM‡
	1A141	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
	1A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
	168 ^T	BGSC* Lab. Dr. Guillermo Gosset, IBT-UNAM ^δ
	1A145	BGSC* Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	CCGE2066	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
	Bi28	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
	CPA	Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	CIAD 100	Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	CIAD 104	Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	CIAD 21	Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Fac. Quím.	Cepario Facultad de Química UNAM
	10A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	10A3	BGSC* Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	FZB42 ^T	BGSC* Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	10A18	BGSC* Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
	CCGE2081	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
	83	Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM ^δ
CCGE2031	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica	
<i>B. licheniformis</i>	Bi43	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
	5A24	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
	5A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
<i>B. pumilus</i>	14A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
	8A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
<i>B. megaterium</i>	Bi55	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
	Fac. Quím 7A1	Cepario Facultad de Química, UNAM BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
<i>B. circulans</i>	16A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
<i>B. sphaericus</i>	13A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>	4A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ
<i>B. mojavensis</i>	JM6-B	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
	JM1-A	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>Brevibacillus brevis</i>	26A1	BGSC* Lab. Dr. Enrique Merino, IBT-UNAM ^δ

Tabla 4.1. Continúa.

Especie	Cepa/Características	Referencia/Fuente
<i>Burkholderia tropica</i>	Ppe8 ^T	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>B. unamae</i>	MTI-641 ^T	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>B. cepacia</i>		CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>B. phymatum</i>		CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>Rhizobium etli</i>	CFN42 ^T	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>R. etli</i> bv. <i>mimosae</i>	Mim1	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>R. etli</i>	CH2410	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>R. tropici</i>	CIAT899	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>R. tropici</i>	CFN299	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>R. tropici</i>	PRF81	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>Pseudomonas putida</i>	KT2442 (pNF142)	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
<i>Escherichia coli</i>	DH5- α , lacZ Δ M15 Quimiocompetentes	CCG-UNAM‡, Lab. Ecología Genómica
Hongos		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM [§]
<i>Fusarium oxysporum</i>		Lab. Dr. Enrique Galindo, IBT-UNAM [§]
Plásmidos		
pCR [®] 2.1	Vector linealizado (3929 pb)	TA Cloning [®] Kit Invitrogen
pTZ57R/T	Vector linealizado (2886 pb)	InsTAclone [™] PCR Cloning Fermentas

*ATCC, American Type Culture Collection *BGSC, *Bacillus* Genetic Stock Center, OHIO, USA ‡CCG-UNAM, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México §IBT-UNAM, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

4.3. Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp. de suelo

Se realizaron aislados de la microbiota endémica de suelos de plantaciones de papaya en cuatro municipios del estado de Yucatán (Tepakán, Teya, Yaxcabá y Sotuta), donde el agente de biocontrol *Bacillus* sp. 83 no ha sido asperjado (ver **Figura 4.2**). Se escogió una plantación de papaya por municipio y por cada una se extrajeron 3 muestras a una profundidad aproximada de 10 cm. Las muestras de cada sitio se mezclaron y homogenizaron, obteniéndose una muestra única. Se pesó 1 g de cada muestra y se suspendió en 10 mL de agua destilada estéril. Las muestras se colocaron en un baño maría a 80 °C durante 30 min. Luego se retiraron y se dejaron incubando durante 24 horas en agitación a 200 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron diluciones seriadas. Cada dilución (10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}) se sembró por triplicado en cajas con medio YPG sólido (la composición del medio se detalla en la **Tabla 4.2**). Las placas se dejaron incubando a 29 °C durante 24 h. Se seleccionaron colonias con morfologías que presentan algunos *Bacillus* spp. Las cepas obtenidas se estiraron en cajas con medio YPG para obtener colonias aisladas y cultivos puros. Las colonias puras fueron identificadas parcialmente, realizándoles tinción de Gram, extracción de

DNA y amplificación del gen *recA* con los oligonucleótidos específicos para este gen de los miembros del género *Bacillus*.



Figura 4.2. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en el estado de Yucatán, para el aislamiento de cepas pertenecientes al género *Bacillus* en plantaciones de papaya (fotos de abajo).

4.4. Conservación de cepas

La conservación de todas las cepas de *Bacillus* sp. utilizadas en este trabajo se realizó en placas con medio LB y medio PY suplementado con Ca^{+2} para cepas de *Rhizobium* spp. Para mantenerlas a largo plazo se crecieron previamente hasta fase logarítmica tardía y se suplementaron con glicerol al 30 % (v/v) para su conservación a -80 °C. Para el uso rutinario, principalmente de las cepas de *Bacillus*, se crecieron alícuotas de estas reservas en medio LB sólido y se mantuvieron a 4 °C por períodos no mayores a 30 días.

4.5. Medios de cultivo y suplementos

Los medios sólidos utilizados fueron YPG, LB (también se usó en forma líquida para cultivos de toda la noche) y PY + Ca^{+2} . La composición de estos medios se detalla en las **Tablas 4.2 a 4.4**.

Los suplementos para la purificación de DNA se detallan en la **Tabla 4.5** y los utilizados para el análisis de colonias transformantes y para la extracción de plásmidos recombinantes, son mostrados en la **Tabla 4.6**.

Tabla 4.2. Composición del medio YPG.

Componentes	Concentración (g L ⁻¹)
Peptona	10
Extracto de Levadura	10
Dextrosa	10
Agar (YPG sólido)	15

Tabla 4.3. Composición del medio Luria (LB).

Componentes	Concentración (g L ⁻¹)
Peptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10
Agar (LB sólido)	15

Tabla 4.4. Composición del medio PY + Ca⁺².

Componentes	Concentración (g L ⁻¹)
Peptona	5
Extracto de Levadura	3
Agregar 1 mL de CaCl ₂ · 2H ₂ O por cada 100 mL de medio	

Tabla 4.5. Soluciones y suplementos para purificación de DNA.

Suplemento	Concentración Stock
Lisozima (Sigma-Aldrich)	10 mg mL ⁻¹
Proteinasa K (Sigma-Aldrich)	20 mg mL ⁻¹
RNasa	10 mg mL ⁻¹
EDTA	0.5 M
Buffer TE pH 8.0	10 mM Tris-Cl y EDTA 1 mM
SDS	10 %
NaCl	5 M
CTAB/NaCl	10 % CTAB en 0.7 M de NaCl

Tabla 4.6. Suplementos usados en el medio LB para colonias transformantes.

Suplemento	Concentración Final
Carbenicilina (Sigma)	100 µg mL ⁻¹
IPTG (Ultrapure™ Invitrogen)	1 mM
X-gal (Research Organics)	24 µg mL ⁻¹

4.6. Purificación de DNA bacteriano

El DNA de *Bacillus* sp. 83 y de las otras cepas mencionadas en la **Tabla 4.1**, fue aislado siguiendo tanto el protocolo propuesto por Wilson (1997) usando los suplementos citados en la **Tabla 4.4** (ver **Anexo 9.1** para la preparación de los suplementos) como con el *kit Wizard® Genomic DNA Purification* de Promega (No. Cat. A1120), partiendo de un cultivo de toda la noche de cada cepa en tubos con 5 mL de medio LB, incubados a 29°C y en agitación a 200 rpm. El DNA fue visualizado en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio.

4.7. Preparación de células competentes de *E. coli* DH5-α

Para hacer posible la incorporación de DNA exógeno, las bacterias deben de estar en un estado competente que permita la transformación (Hanahan, 1983). El protocolo seguido para la obtención de

bacterias competentes, se basa en someter a las bacterias a un choque térmico en presencia de cationes divalentes. Una colonia bacteriana cultivada en caja Petri se creció en 5 mL de medio LB por 8 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0.4 a 0.5. El cultivo se depositó en hielo y se centrifugó durante 5 min a 3600 rpm a 4°C. Se retiró todo el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió lentamente en 40 mL de la solución **Tfbl**. La solución se incubó en hielo durante 5 min, posteriormente, se centrifugó (bajo las condiciones antes mencionadas) y el precipitado se resuspendió en 4 mL de la solución **TfbII**. La solución se incubó en hielo por 10 min. Se hicieron alícuotas de 200 µL y se guardaron a -70°C (ver **Anexo 9.1** para la composición de las soluciones).

4.8. Caracterización molecular parcial de *Bacillus* sp. 83

En el laboratorio se mantiene al agente de control biológico *Bacillus* sp. 83 criopreservado a -80°C en glicerol al 30 %. Fue proporcionada por personal de la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología tanto en glicerol como parte del formulado en polvo *Fungifree AB*®. Las características morfológicas de las colonias de la cepa 83 muestran una forma circular, borde ondulado, elevación plana, textura viscosa y color crema. La **Figura 4.3** muestra las colonias de la cepa 83.

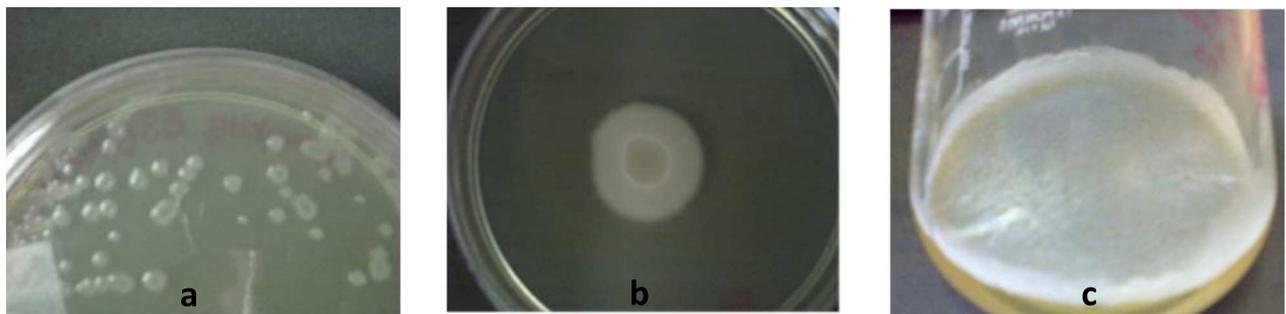


Figura 4.3. Colonias del agente de control biológico *Bacillus* sp. 83 crecidas en a) medio LB, b) estructura de *biofilm* en medio LB sólido y c) *biofilm* en medio LB líquido.

4.8.1. Identificación molecular de *Bacillus* sp. 83

La cepa de control biológico *Bacillus* sp. 83 fue identificada molecularmente a través del análisis de las secuencias de la amplificación de los genes, 16S rDNA y *recA*. La amplificación del gen 16S rDNA se realizó con los oligonucleótidos universales fD1/rD1 que amplifican un fragmento de 1500 pb. Por otra parte, para la amplificación del gen *recA* se utilizaron los oligonucleótidos *recA-f/recA-r* propuestos por Kwon *et al.*, (2009) que amplifican un fragmento de 850 pb. Las secuencias de los dos pares de oligonucleótidos se detallan en la **Tabla 4.7**; mientras que las condiciones de amplificación para cada gen se mencionan en las **Tablas 4.8 y 4.9**.

El fragmento del gen 16S rDNA fue clonado en el vector pCR®2.1 de *TA Cloning® Kit* de Invitrogen (No. Cat. K2030-01). La selección de colonias transformantes de *E. coli* DH5- α se realizó en cajas de LB sólido suplementadas con Carbenicilina₁₀₀ (Cb), IPTG₁ y X-gal₂₄. Se seleccionaron 20 colonias para analizarse por PCR con los oligonucleótidos universales *M13 Forward (-20)* y *M13 Reverse* de Invitrogen (No. Cat. N520-02 y N530-02, respectivamente). El plásmido elegido que contenía el fragmento del gen 16S rDNA, fue purificado de un cultivo de toda la noche de la colonia transformante en 5 mL de LB suplementado con Cb₁₀₀ y posteriormente se siguieron las instrucciones del kit *GeneJET™ Plasmid miniprep kit* de Fermentas (No. Cat. K0503), para enviarse a secuenciar.

En lo que respecta al fragmento del gen *recA* de *Bacillus* sp. 83, el producto amplificado se purificó de acuerdo al protocolo de *High Pure PCR Product Purification Kit®* de Roche (No. Cat. 11 732 676 001).

Los fragmentos amplificados de los genes 16S rDNA y *recA* fueron observados en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. La pureza del producto de PCR del gen *recA* se confirmó con un nuevo corrimiento en gel de agarosa al 1 %.

Tabla 4.7. Oligonucleótidos utilizados para la identificación molecular de *Bacillus* sp. 83.

Nombre	Gen	Secuencia (5'→3')	Referencia
fD1	16S rDNA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
rD1	16S rDNA	AAG GAG GTG ATC CAG CC	
recA-f	<i>recA</i>	TGA GTG ATC GTC AGG CAG CCT TAG CYT	Kwon <i>et al.</i> , 2009
recA-r	<i>recA</i>	BRG ATA AGA RTA CCA WGM ACC GC	

Tabla 4.8. Condiciones de PCR para amplificación del gen 16S rDNA.

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización	94	45 s	
Alineamiento	55	1	35
Extensión	72	2	
Extensión Final	72	5	1

Tabla 4.9. Condiciones de PCR para amplificación del gen *recA*.

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	
Alineamiento	55	35 s	30
Extensión	72	40 s	
Extensión Final	72	10	1

Los fragmentos de ambos genes, se secuenciaron en la empresa Macrogen Inc (Corea). La secuenciación del gen 16S rDNA se realizó con los oligonucleótidos *M13 forward* y *reverse*; mientras que para el fragmento del gen *recA*, se enviaron los oligonucleótidos con los que fue amplificado.

Las secuencias parciales (*forward* y *reverse*) de cada gen se limpiaron manualmente y se concatenaron utilizando el programa *BioEdit* v 7.1.3 (*Sequence Alignment Editor*). Posteriormente, la identificación molecular se realizó comparando la secuencia obtenida de los genes 16S rDNA y *recA* contra las secuencias nucleotídicas reportadas en la base de datos del NCBI (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mediante el algoritmo BLASTN (Altschul *et al.*, 1990).

Con la secuencia del gen *recA*, se construyó un árbol filogenético para agrupar de manera gráfica a *Bacillus* sp. 83. Se obtuvo de la página del *Taxonomy Browser* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>) una colección de secuencias taxonómicamente relacionadas con *Bacillus* sp. 83. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa *CLUSTAL X* (Thompson *et al.*, 1997), posteriormente se editaron y confirmaron visualmente con el programa *SeaView*. (Gouy *et al.*, 2010). El programa *JMODELTEST* 3.06 fue usado para seleccionar el modelo más apropiado de sustitución nucleotídica por el método de Akaike (AIC) (Posada y Buckley, 2004). El modelo TrN + I + G ($\alpha=0.4650$ para la distribución gamma; A=0.3047, C=0.2023, G=0.2470, T=0.2459, p-inv= 0.3650) fue elegido para la búsqueda del árbol. Los análisis de máxima verosimilitud fueron llevados a cabo usando el *software PhyML* 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) disponible en <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>).

Por otro lado, con el propósito de conocer la similitud entre la secuencia de *Bacillus* sp. 83 y las disponibles en la base de datos, se construyeron matrices de similitud nucleotídica para el gen *recA* con el programa *MatGAT* v 2.02. Valores mayores a 95 % fue asignado para el nivel taxonómico de género y especie (Schloss y Handelsma, 2005).

4.8.2. Amplificación de genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos producidos por *Bacillus* sp. 83

Con la finalidad de tener un mejor entendimiento del mecanismo de *Bacillus* sp. 83 para el control biológico de enfermedades como la antracnosis, en este estudio se evaluó, mediante PCR, la presencia de genes involucrados en la producción de los antibióticos iturina A, surfactina y macrolactina D.

Bacillus sp. 83 fue evaluado, al igual que las cepas de *B. amyloliquefaciens* CCGE2081 y *B. subtilis* CPA, para detectar en su genoma la presencia de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios como antibióticos. Se utilizaron tres pares de oligonucleótidos que habían sido previamente descritos (**Tabla 4.10**) para amplificar los genes de *ituD*, *srfAA* y *mlnA*. Como controles en la amplificación de los tres genes se usaron cepas tipo; para el positivo *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T y para el negativo *B. subtilis* 168^T.

Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf) usando las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos que incluían: 1 minuto a 95 °C (desnaturalización), temperaturas de hibridación a 55, 58 y 60 °C durante 1 min para *ituD*, *mInA* y *srfAA*, respectivamente, y, finalmente 1 minuto a 72°C. La amplificación se completó con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Al finalizar las reacciones de PCR, 5 µL de cada uno de los productos fueron separados por electroforesis a 100 V en un gel de agarosa al 1 %. Los tamaños amplificados fueron comparados con los reportados. Para la confirmación de cada amplicón con respecto a los genes dirigidos, se realizaron *in silico* reacciones de PCR y el análisis de la secuencia de cada fragmento correspondiente a cada gen (disponible en la página <http://insilico.ehu.es/PCR/>).

Se realizó también en este estudio un ensayo de antagonismo *in vitro* de *Bacillus* sp. 83 contra los hongos *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* únicamente para evaluar de forma cualitativa el crecimiento de los hongos. El monitoreo se realizó durante 10 días y se comparó con la detección de los genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos (ver **Anexo 9.2**). Morales *et al.*, (2007) y Solís *et al.*, (2010) lo realizaron anteriormente de forma cuantitativa con los metabolitos producidos por la cepa.

Tabla 4.10. Oligonucleótidos utilizados para amplificar genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos.

Nombre	Gen	Secuencia (5'->3')	Tamaño esperado	Referencia
Srfkn-1 Srfkn-2	<i>srfAA</i>	AGC CGT CCT GTC TGA CGA CG TCT GCT GCC ATA CCG CAT AGT C	1750 pb	Koumoutsis <i>et al.</i> , 2004
mIn-c1 mIn-c2	<i>mInA</i>	ATG CTG TTG CAG GAC ATA GTC TAG TCA GAA TGT TTC CAG GAC C	575 pb	Schneider <i>et al.</i> , 2007
ituD-f ituD-r	<i>ituD</i>	ATG AAC AAT CTT GCC TTT TTA TTA TTT TAA AAT CCG CAA TT	1203 pb	Hsieh <i>et al.</i> , 2008

4.9. Análisis de huellas genómicas de *Bacillus* sp. 83

El DNA genómico de *Bacillus* sp. 83 fue evaluado con el DNA de un conjunto de cepas citadas en la **Tabla 4.1** para encontrar las condiciones de amplificaciones óptimas y reproducibles y detectar productos específicos. La cantidad de DNA de las cepas usadas en el estudio se midió espectrofotométricamente en un equipo *Thermo Scientific NanoDrop™* 2000 y se ajustó la concentración a 30 ng. La calidad de los DNAs aislados de las bacterias se comprobó siempre mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Los oligonucleótidos para todos los ensayos, excepto para la amplificación del gen 16S rDNA, fueron sintetizados en la Unidad de Oligonucleótidos y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. En la **Tabla 4.11** se detallan las secuencias de los oligonucleótidos de **RAPD**, **BOX** y **ERIC** utilizados para el análisis del perfil genómico de *Bacillus* sp. 83.

Para todas las reacciones de PCR se utilizaron reactivos de Invitrogen como la *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen No. Cat. 10342-020.) y se realizaron por lo menos tres veces, para establecer la reproducibilidad de los productos amplificados y encontrar fragmentos discriminatorios y únicos del agente de biocontrol.

Tabla 4.11. Oligonucleótidos utilizados para los perfiles con RAPD, BOX y ERIC de *Bacillus* sp. 83.

Nombre	Secuencia (5'->3')	Referencia
ERIC 1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCAC	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
ERIC 2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
RAPD-OPG5	CTG AGA CGG A	Daffonchio <i>et al.</i> , 1998
RAPD-OPG8	TCA CGT CCA C	Daffonchio <i>et al.</i> , 1998
RAPD-OPG11	TGC CCGTCG T	Daffonchio <i>et al.</i> , 1998
RAPD-OPG16	AGC GTC CTC C	Daffonchio <i>et al.</i> , 1998
BOX-A1R	CTA CGG CAA GGC GCA GCT GAC G	De Clerck y De Vos, 2004

4.9.1. Polimorfismos del DNA de *Bacillus* sp. 83 amplificados al azar (RAPD)

Para la detección de polimorfismos se utilizaron cuatro oligonucleótidos OPG que previamente habían sido utilizados por Felici *et al.*, (2008) para el agente de control biológico *B. subtilis* 101. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 µL conteniendo 30 ng de DNA molde, 2 µL de *Buffer* de PCR 10 X proporcionado con la enzima, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM del oligonucleótido respectivo, 1 µL de DMSO, y 1 U de *Taq* polimerasa.

Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf) y consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos que incluían: 1 minuto a 94°C, 1 minuto evaluando dos temperaturas 36 y 40°C, y, finalmente un tiempo de 3 minutos a 72°C. Después de los 35 ciclos, la amplificación se completó con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

4.9.2. Amplificación de secuencias de los elementos BOX de *Bacillus sp. 83*

Las reacciones de amplificación con el oligonucleótido BOX-A1R (De Clerck y De Vos, 2004) se llevaron a cabo en el termociclador *Mastercycler® gradient* (Eppendorf). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 μL conteniendo 30 ng de DNA molde, 2 μL de *Buffer* de PCR 10 X, 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 0.75 μM del oligonucleótido BOX-A1R, 2 μL de DMSO y 1 U de polimerasa.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que incluían: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 54°C, y, finalmente un tiempo de 1 minuto a 72°C. La amplificación se completó con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

4.9.3. Amplificación de elementos ERIC de *Bacillus sp. 83*

Las reacciones de amplificación para los oligonucleótidos ERIC 1R/ERIC 2 (Versalovic *et al.*, 1991) se llevaron a cabo en el termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystem). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 15 μL conteniendo 30 ng de DNA molde, 1.5 μL de *Buffer* de PCR 10 X, 7.5 mM de MgCl_2 , 1.25 mM dNTPs, 0.4 μM de cada oligonucleótido (ERIC 1R y ERIC 2), 1.5 μL de DMSO y 1 U de polimerasa.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos que incluían: 45 segundos a 93°C, 1 minuto a 45 y 50°C, y, finalmente un tiempo de 8 minutos a 65°. La amplificación se completó con una extensión final a 65°C durante 16 minutos.

4.9.4. Separación de los productos rep-PCR y RAPDs amplificados en gel de agarosa

Se utilizaron 10 μL de los productos amplificados de las reacciones de RAPD, BOX y ERIC para ser separados en un gel de agarosa al 2.0 %. La electroforesis se realizó a 100 V durante 2 h; usando como *Buffer* de corrida TAE 1X (ver **Anexo 9.1**) y se incluyó marcador de DNA de peso molecular conocido de 1 Kb plus (Invitrogen No. Cat.10787-018). El gel fue teñido con bromuro de etidio.

4.10. Clonación y secuenciación de los fragmentos RAPD, BOX y ERIC seleccionados

4.10.1. Clonación de los fragmentos de *Bacillus sp. 83*

Se comparó el perfil genómico de *Bacillus sp. 83* con el resto de las cepas utilizadas, generado con cada técnica y se seleccionaron fragmentos de RAPD, BOX y ERIC que parecían estar sólo dentro del genoma de la cepa 83. La comparación de cada fragmento se realizó de forma cualitativa (presencia o ausencia de bandas en la cepa 83 con respecto a las evaluadas). Los fragmentos de interés se cortaron del gel de agarosa y se purificaron con *QIAquick Gel Extraction Kit* de QIAGEN (No. Cat. 28706) siguiendo las instrucciones del

fabricante. Se visualizaron 5 μL de la purificación correspondiente a cada fragmento en un gel de agarosa al 2 %, incluyendo marcador de DNA de peso molecular de 1 Kb. Posteriormente, 1.0 μL de cada purificación fue amplificado con el oligonucleótido correspondiente para verificar su identidad.

La clonación de cada fragmento se llevó a cabo con el *InstAclone™ PCR Cloning Kit* de Fermentas (No. Cat. K1214). Los fragmentos purificados y el perfil completo amplificado con el oligonucleótido BOX-A1R se ligaron por separado al plásmido pTZ57R/T (Fermentas). La mezcla de ligación (3 μL del vector, 6 μL *buffer* de ligación, 1 μL DNA T4 ligasa, 6 μL banda purificada BOX y de RAPD, 10 μL de banda ERIC) se incubó toda la noche a 4°C. En el **Anexo 9.3** se muestra el mapa del vector.

4.10.2. Transformación de células competentes de *E. coli* DH5- α

Se prepararon células químicamente competentes de *E. coli* DH5- α para realizar las transformaciones correspondientes. El DNA plasmídico fue incorporado a las células de *E. coli* DH5- α por el método de choque térmico (Hanahan, 1983). Se colocaron 4.5 μL de la ligación correspondiente a cada fragmento de interés, en tubos eppendorf de 1.5 mL que contenían 66 μL de células competentes y se mezcló suavemente. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42°C durante 1 minuto, transfiriéndose inmediatamente en hielo e incubándolas durante 2 min. Posteriormente, a cada mezcla se le adicionaron 300 μL de medio LB y se incubaron a 37 °C en agitación a 200 rpm durante 1 h. Se sembraron 100 μL de cada mezcla por triplicado en cajas con medio LB que contenían el antibiótico Carbenicilina₁₀₀ (Cb), IPTG₁ y X-gal₂₄. Las cajas se incubaron durante 18 h a 37°C.

4.10.3. Selección de colonias y análisis de transformantes

Las clonas portadoras del plásmido fueron seleccionadas por color (β -galactosidasa) y resistencia al antibiótico. Para su análisis se picaron las colonias y cada una se resuspendió en 20 μL de una solución estéril de MgSO₄ y Tween 20, en tubos eppendorf de 0.6 mL. Se sembraron 3 μL de cada mezcla en cajas con LB, Cb₁₀₀, X-gal₂₄ e IPTG₁ y se incubaron a 37 °C durante 20 h. El resto de la suspensión se lisó a 95 °C por 10 minutos. Para la confirmación de la longitud de los insertos en los plásmidos, se utilizó 1 μL del lisado y se analizó por PCR con los oligonucleótidos *M13 Forward* (-20) y *T7 Promoter*.

Las clonas seleccionadas se estriaron en cajas con LB suplementadas con Cb₁₀₀ y se incubaron a 37 °C por 16 h para tener colonias aisladas. Para la extracción de cada plásmido, se sembró una colonia correspondiente a cada fragmento en tubos con 5 mL de LB y Cb₁₀₀, incubada toda la noche a 37 °C en agitación (200 rpm). La extracción del plásmido se realizó siguiendo el procedimiento del *High Pure Plasmid Isolation Kit®* de Roche. Posteriormente, se verificaron los plásmidos purificados por medio de un análisis de

restricción con las enzimas *EcoRI* (New England Biolabs®) y *HindIII* (Invitrogen™) para asegurar la presencia del inserto.

4.10.4. Secuenciación de los fragmentos seleccionados de RAPD, BOX y ERIC, y el perfil genómico obtenido con BOX-A1R

Cada uno de los insertos clonados en el vector pTZ57R/T, fueron secuenciados en ambas direcciones con los oligonucleótidos *M13 Forward (-20)* y *T7 Promoter*, por la empresa Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y concatenadas con el programa *BioEdit v 7.1.3*. Posteriormente, se realizó la búsqueda de homologías de las secuencias de cada fragmento contra las secuencias nucleotídicas reportadas en la base de datos del NCBI, utilizando el algoritmo BLASTN.

4.11. Diseño de un procedimiento de identificación basado en un marcador molecular

4.11.1. Diseño y evaluación de los oligonucleótidos como posibles marcadores

Para el diseño de los oligonucleótidos como posibles marcadores específicos del agente de control biológico, se seleccionaron las secuencias correspondientes al genoma de *Bacillus* sp. 83 que resultaron con baja similitud al ser comparadas con las secuencias nucleotídicas reportadas en la base de datos del NCBI. El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo con los programas *Oligo*® v 7 (*Primer Analysis Software*) y *Primer 3* v 0.4.0 (disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>). Las secuencias seleccionadas fueron alineadas con las reportadas en el *GenBank* usando el programa *ClustalW2* desde *BioEdit* con la finalidad de buscar las regiones menos conservadas entre ellas, que no fueran mayores a 300 pb y que no fueran parte de genes del metabolismo central ya que podían limitar la especificidad.

Como primera etapa, se evaluaron los oligonucleótidos diseñados usando el termociclador *Mastercycler*® *gradient* (Eppendorf). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10 µL conteniendo 30 ng de DNA molde (*Bacillus* sp. 83 y cepas de *B. amyloliquefaciens*), 1 µL de *Buffer* de PCR 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.08 mM dNTPs, 0.1 µM de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*) y 1 U de polimerasa. Las condiciones de amplificación se detallan en la **Tabla 4.12**. Los productos amplificados fueron resueltos en electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 100 V.

Tabla 4.12. Condiciones de PCR para evaluar marcadores diseñados.

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94	4	1
Desnaturalización	94	45s y 1	
Alineamiento	60 y 68	45 s y 1	35
Extensión	72	45 s y 1	
Extensión Final	72	5	1

4.11.2. Evaluación de la especificidad de los marcadores

La especificidad de los marcadores fue evaluada sólo con aquellos que fueron altamente específicos al genoma de *Bacillus* sp. 83 en la primera etapa, mediante PCR convencional. Para lo anterior, se utilizaron 30 ng de DNA de cultivos puros de cada una de las cepas de *Bacillus* y de otros géneros asociados a plantas como *Rhizobium*. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10 μ L conteniendo: 30 ng de DNA molde, 1 μ L de *Buffer* de PCR 10 X, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.08 mM dNTPs, 0.1 μ M del oligonucleótido seleccionado y 1 U de polimerasa. Para la amplificación se tomaron en cuenta las mejores condiciones que resultaron con el marcador específico (ver **Tabla 4.13**). Los productos amplificados fueron resueltos en electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 100 V.

Tabla 4.13. Condiciones de PCR para el marcador específico de *Bacillus* sp. 83.

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94	4	1
Desnaturalización	94	45 s	
Alineamiento	68	45 s	35
Extensión	72	45 s	
Extensión Final	72	5	1

Como control positivo para determinar la veracidad de los resultados de especificidad del marcador seleccionado, se decidió amplificar en todas las bacterias evaluadas, el fragmento del gen 16S rDNA con los oligonucleótidos universales fD1/rD1, usando los 30 ng de DNA, bajo las condiciones descritas en la **Tabla 4.8**. El producto de amplificación de la reacción se visualizó en un gel de agarosa al 1 %.

4.11.3. Evaluación del límite de detección de los marcadores

El límite de detección de los marcadores fue evaluado mediante PCR convencional a través de tres experimentos, bajo las condiciones de amplificación por PCR convencional descritas en la **Tabla 4.13**.

El primero consistió en evaluar concentraciones conocidas de DNA genómico purificado tanto de un cultivo de células vegetativas de *Bacillus* sp. 83 como de un cultivo procedente de 100 mg del formulado *Fungifree AB*[®]. A este último se le realizó un paso de enriquecimiento previo a la extracción de DNA, en 5 mL de medio LB y se dejó incubar durante toda la noche a 29°C en agitación (200 rpm).

Una vez extraído el DNA se ajustó a 30 ng μ L⁻¹ tanto para células vegetativas como para las células procedentes del formulado. Se realizaron diluciones seriadas (1:10) de los 30 ng μ L⁻¹ de DNA hasta la

concentración de $3 \times 10^{-5} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y se amplificó la región única de la cepa 83 con los marcadores que mostraron especificidad (la estrategia del experimento se muestra en la **Figura 4.4**).

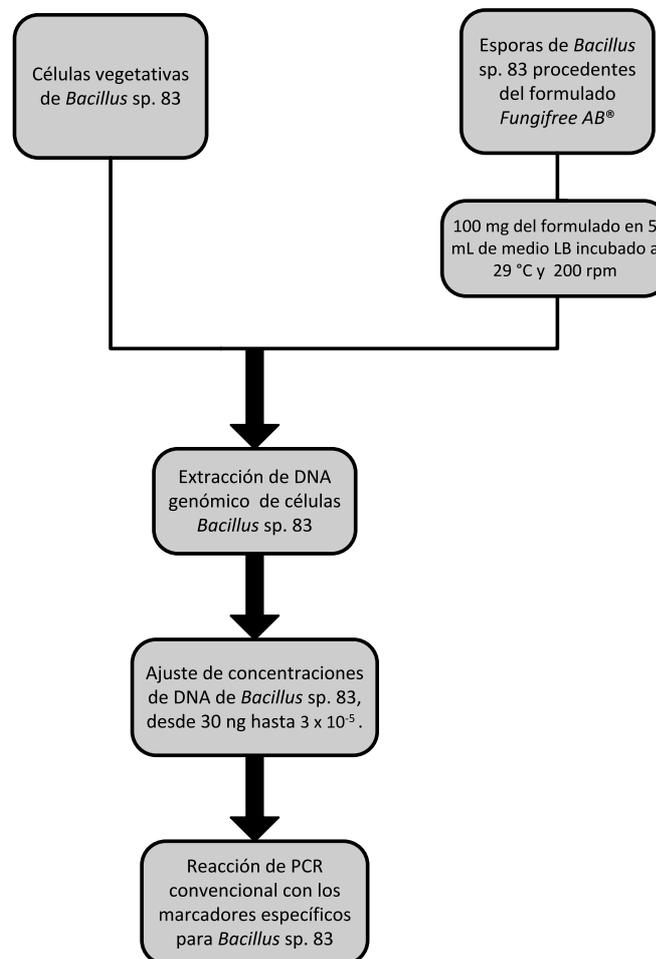


Figura 4.4. Estrategia para evaluar la capacidad de los marcadores diseñados para *Bacillus sp. 83* con concentraciones conocidas de DNA de la bacteria.

El segundo y tercer experimento consistieron en monitorear la persistencia de *Bacillus sp. 83* sobre hojas de papayo. Las hojas se utilizaron tal y como provenían del campo sin someterlas a ningún proceso de esterilización antes de la inoculación con la cepa 83.

Con respecto al segundo experimento, se preparó una suspensión en medio LB que contenía en promedio 3.1×10^7 de células vegetativas de *Bacillus sp. 83* por cada mililitro. Las células de *Bacillus sp. 83* se crecieron en un matraz con 30 mL de medio LB durante 12 h, para después ajustarlas a la densidad celular mencionada. Se asperjó aproximadamente 1 mL de la suspensión celular sobre la superficie de cada hoja (ver **Figura 4.5**). El monitoreo se llevó a cabo a las 2 h y a los 1, 2, 4 y 6 días después de la aspersión. Se utilizaron 3 hojas por día de muestreo.

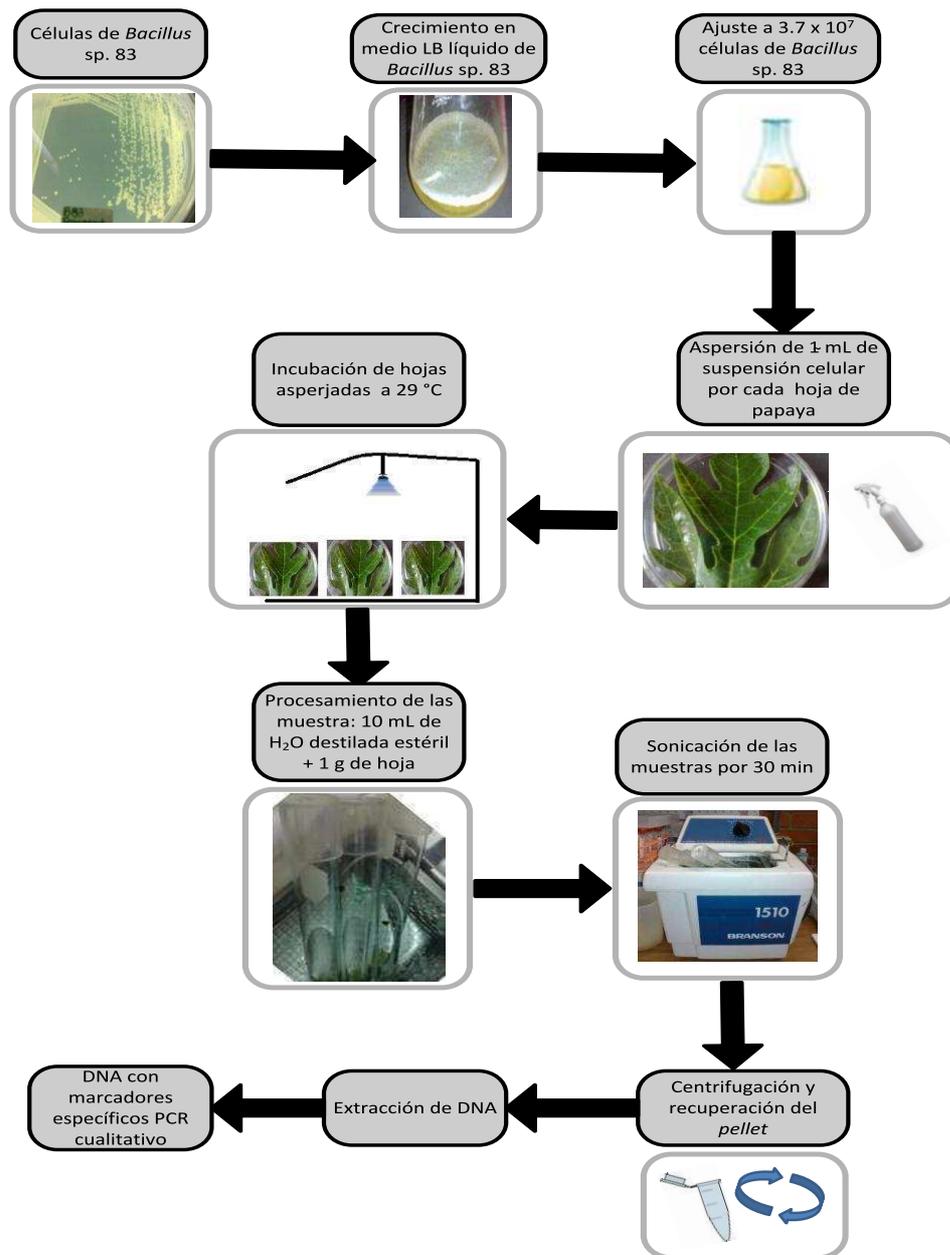


Figura 4.5. Estrategia para evaluar la capacidad de los marcadores diseñados, con DNA de células vegetativas de *Bacillus* sp. 83 asperjadas en hojas de papaya.

Finalmente, se determinó la habilidad de los marcadores para identificar a *Bacillus* sp. 83 presente en el formulado Fungifree AB® cuando fue asperjado sobre un ambiente heterogéneo como las hojas de papaya. Se preparó una suspensión del polvo, bajo la concentración de 1×10^7 esporas de *Bacillus* sp. 83 por cada g del formulado. Posteriormente se asperjó aproximadamente 1 mL de la suspensión sobre la superficie de

cada porción de hoja de papayo (ver **Figura 4.6**). El período de monitoreo para la identificación del agente de biocontrol se realizó a las 2 h y a los 1, 2, 4, 8 y 11 días después de la aspersión.

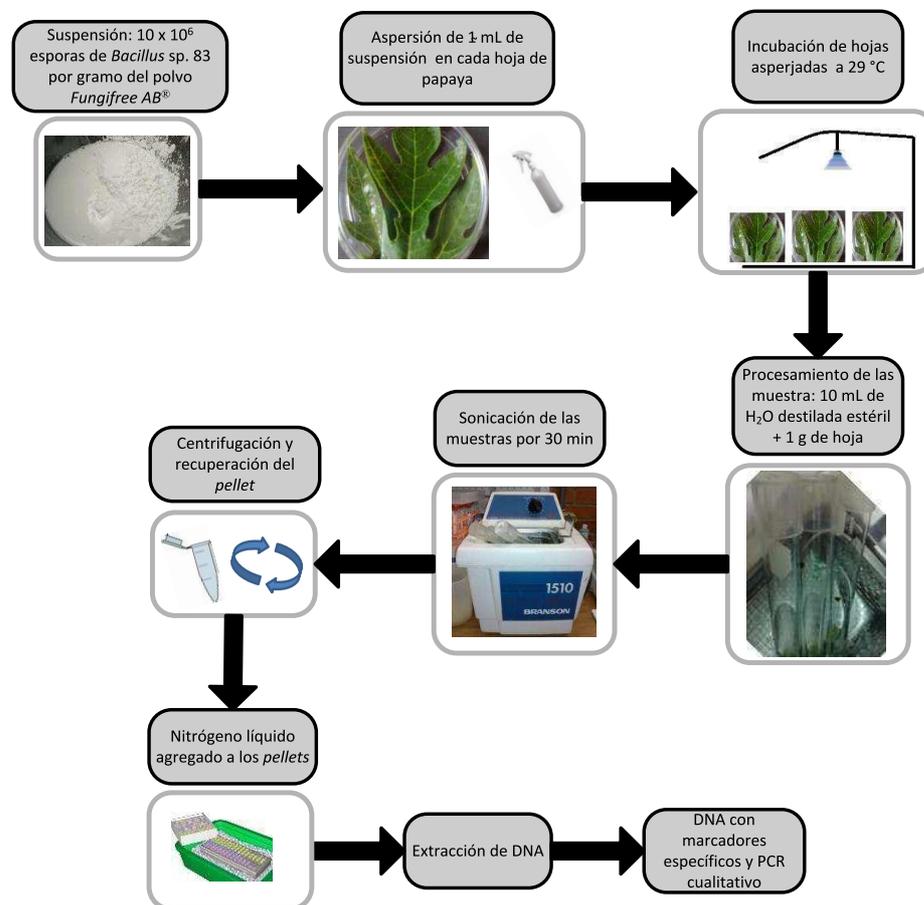


Figura 4.6. Estrategia para evaluar la capacidad de los marcadores diseñados, con DNA de esporas de *Bacillus* sp. 83 presentes en el formulado *Fungifree AB*[®] asperjadas en hojas de papayo.

Las hojas del segundo y tercer experimento se incubaron en cajas Petri a 29°C en la cámara de cultivo para plantas del laboratorio de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas-UNAM. Transcurrido el tiempo de incubación correspondiente al día de monitoreo, se retiraron las hojas y se utilizó aproximadamente 1 g de cada una para la extracción de DNA total (mezcla de microorganismos).

La extracción de DNA total presente en las hojas se realizó de acuerdo a las instrucciones del *kit Wizard[®] Genomic DNA Purification* (Promega), con un paso previo de sonicación (*Branson Modelo 1510-MT*) de 1 g de hoja suspendido en 10 mL de agua estéril, durante 30 minutos. Posteriormente, se recuperaron 6 mL del

producto sonicado y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 1 min (centrífuga 5415 C Eppendorf). El *pellet* fue utilizado para la extracción de DNA de acuerdo al protocolo del *kit* mencionado. Hasta este paso se procesaron las hojas asperjadas con células del cultivo puro de *Bacillus* sp. 83. Por otro lado, los *pellets* procedentes del lavado de hojas inoculadas con esporas presentes en el formulado, se trataron con nitrógeno líquido para romper las células y extraer el DNA siguiendo las instrucciones del *kit*.

La calidad de los DNAs se visualizó en un gel de agarosa al 1 %. Posteriormente, se utilizó 0.5 µL de cada DNA (1:10) para ser evaluado por PCR con los marcadores que mostraron especificidad para *Bacillus* sp. 83.

5. Resultados y Discusión

5.1. Confirmación de los aislados de Yucatán como integrantes del género *Bacillus*

Las especies de *Bacillus* son ubicuas en la naturaleza y se encuentran en mayor proporción en los suelos, por lo que resulta de gran utilidad usar muestras de este tipo como fuente de inóculo para aislar cepas de este género. A partir del protocolo que se usó para el aislamiento, se obtuvieron 50 diferentes colonias de las distintas muestras de suelo, de las cuales se seleccionaron 30 que resultaron ser Gram positivas por la tinción de Gram, morfotipo colonial parecido a *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Finalmente, la amplificación del gen *recA* permitió la identificación molecular de 23 cepas que pertenecen al género *Bacillus*, al mostrar cada una un fragmento de 850 pb (**Figura 5.1**). Este grupo de bacterias se utilizó para la comparación de perfiles genómicos con el agente de biocontrol *Bacillus* sp. 83 (ver **Tabla 5.1**). Con el aislamiento de estos microorganismos se pudo identificar si en el ambiente donde será asperjada la cepa 83, no está presente otro microorganismo con características fenotípicas y genotípicas parecidas y que pudiera influir también en el control de la enfermedad.

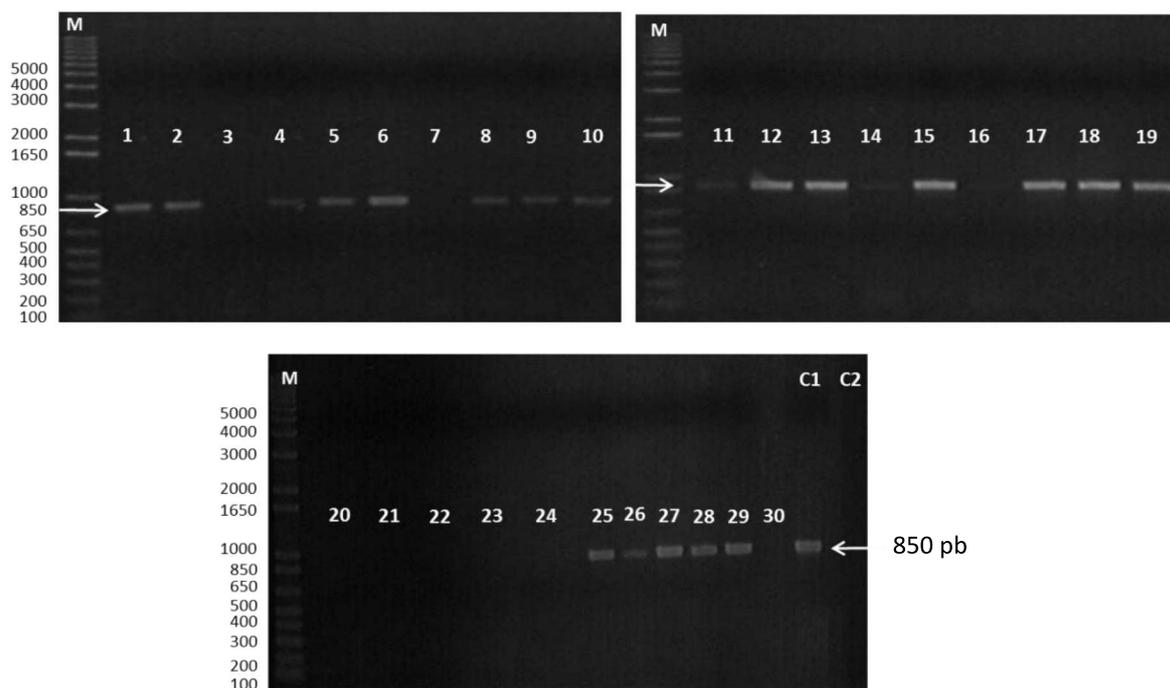


Figura 5.1. Identificación de los aislados del estado de Yucatán pertenecientes al género *Bacillus* mediante la amplificación del gen *recA*. (1) TP1,(2) TP2,(3) TP3,(4) TP4, (5) TP5 (6) TP6, (7) TP8,(8) TP9, (9) TP10, (10) TP11, (11) TP13, (12) TP14,(13) S15, (14) TP17, (15) S19, (16) Teya 21, (17) Teya 22, (18) Teya 23, (19) Yax 24, (20) TP12, (21) TP16, (22) TP20, (23) TP26, (24) TP27, (25) S30, (26) TP31, (27) TP32, (28) TP34, (29) TP36, (30) TP28. (C1) Control positivo (DNA de *B. subtilis* 168^T), (C2) Control negativo (sin DNA). (M) Marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen).

Tabla 5.1. Cepas del género *Bacillus* aisladas de diferentes municipios del estado de Yucatán para evaluarlas con *Bacillus* sp. 83 mediante las técnicas rep-PCR y RAPD.

No. de cepa en el gel	Cepa	Fuente
1	<i>Bacillus</i> sp. TP 1	Tepakán, Yucatán.
2	<i>Bacillus</i> sp. TP 2	Tepakán, Yucatán
4	<i>Bacillus</i> sp. TP 4	Tepakán, Yucatán
5	<i>Bacillus</i> sp. TP 5	Tepakán, Yucatán
6	<i>Bacillus</i> sp. TP 6	Tepakán, Yucatán
7	<i>Bacillus</i> sp. TP 8	Tepakán, Yucatán
8	<i>Bacillus</i> sp. TP 9	Tepakán, Yucatán
9	<i>Bacillus</i> sp. TP 10	Tepakán, Yucatán
10	<i>Bacillus</i> sp. TP 11	Tepakán, Yucatán
11	<i>Bacillus</i> sp. TP 13	Tepakán, Yucatán
12	<i>Bacillus</i> sp. TP 14	Tepakán, Yucatán
13	<i>Bacillus</i> sp. S 15	Sotuta, Yucatán
14	<i>Bacillus</i> sp. TP 17	Tepakán, Yucatán
15	<i>Bacillus</i> sp. S 19	Sotuta, Yucatán
16	<i>Bacillus</i> sp. Teya 21	Teya, Yucatán
17	<i>Bacillus</i> sp. Teya 22	Teya, Yucatán
18	<i>Bacillus</i> sp. Teya 23	Teya, Yucatán
19	<i>Bacillus</i> sp. Yax 24	Yaxcabá, Yucatán
25	<i>Bacillus</i> sp. S 30	Souta, Yucatán
26	<i>Bacillus</i> sp. TP 31	Tepakán, Yucatán
27	<i>Bacillus</i> sp. TP 32	Tepakán, Yucatán
28	<i>Bacillus</i> sp. TP 34	Tepakán, Yucatán
29	<i>Bacillus</i> sp. S 36	Sotuta, Yucatán

5.2. Caracterización molecular parcial de *Bacillus* sp. 83

5.2.1. Determinación de la especie del agente de biocontrol *Bacillus* sp. 83

La amplificación del gen ribosomal de *Bacillus* sp. 83, generó un fragmento esperado de 1500 pb (**Figura 5.2a**). La búsqueda y comparación de similitudes de la secuencia nucleotídica de este fragmento con las reportadas en la base de datos, mostró 99 % de identidad con las dos secuencias más próximas en el *GenBank*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T y *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T.

Debido a la similitud que obtuvo *Bacillus* sp. 83 con las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* a nivel del gen ribosomal, y que no ayudó en su diferenciación, se realizó la amplificación del gen *recA* para confirmar la identificación molecular de la cepa 83. El gen *recA* fue seleccionado, porque ha demostrado ser efectivo para discriminar entre especies cercanas del grupo de *B. subtilis* en los trabajos de Arguelles-Arias *et al.*, (2009) y Alvarez *et al.*, (2011) con agentes de biocontrol.

Se generó un fragmento de 824 pb (**Figura 5.2b**) y su secuencia presentó el 99 % de identidad con *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T y el 85 % con *B. subtilis* subsp. *subtilis* BSn5 y *B. subtilis* subsp. *spizizenii* W23 cepas más próximas en el análisis del BLASTN. La **Figura 5.3** muestra la topología del árbol filogenético obtenida por máxima verosimilitud de la secuencia del gen *recA* de la cepa 83, agrupándola con

B. amyloliquefaciens subsp. *plantarum* YAUB9601-Y2, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU-B946 y *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T, y separándola filogenéticamente de *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T.

Recientes estudios taxonómicos han revelado que el grupo *B. subtilis* es muy heterogéneo, y se ha considerado como un complejo de especies muy cercanas, por lo que la identificación molecular entre sus integrantes requiere de más de un marcador genético para identificarlos, ya que *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* son fenotípicamente similares y pueden ser fácilmente confundibles (Reva *et al.*, 2004).

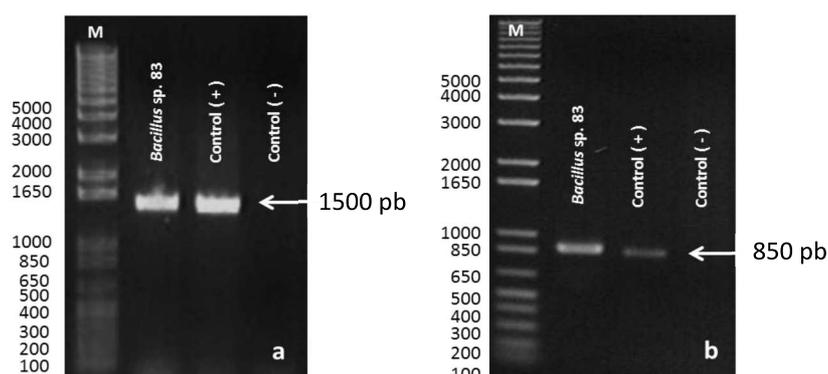


Figura 5.2. Fragmentos amplificados de los genes a) 16S rDNA y b) *recA* de *Bacillus* sp. 83. Control (+) *Burkholderia unamae* MTI-641^T y *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T, respectivamente. Control negativo (sin DNA). (M): Marcador de peso molecular 1 Kb.

Tabla 5.2. Identidad entre la secuencia nucleotídica del gen *recA* de *Bacillus* sp. 83 y otras bacterias.

% de identidad nucleotídica							
Cepas	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 ^T	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	<i>B. amyloliquefaciens</i> XH7	<i>Bacillus</i> sp. 83	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YAU B9601-Y2	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 ^T	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU-B946
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 ^T		84.6	84.6	84.5	84.5	84.8	84.9
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T	84.3		100	98.7	98.5	98.9	98.5
<i>B. amyloliquefaciens</i> XH7	84.3	99.6		98.7	98.5	98.9	98.5
<i>Bacillus</i> sp. 83	84.2	98.3	98.3		99.9	99.8	98.9
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YAU B9601-Y2	84.2	98.2	98.2	99.5		99.6	98.8
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 ^T	84.4	98.5	98.5	99.4	99.3		99.2
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU-B946	84.5	98.2	98.2	98.5	98.4	98.8	

Anteriormente, *Bacillus* sp. 83 fue caracterizado como *B. subtilis* 83, en base a sus características fenotípicas, sin embargo, la matriz de identidad nucleotídica construida con la secuencia del gen *recA* mostró 99.9 % de identidad con la secuencia de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAUB9601-Y2, mientras que con *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T fue de 84.2 % (Tabla 5.2), por lo que se propone que la cepa 83 debería ser reasignada a la especie *B. amyloliquefaciens*.

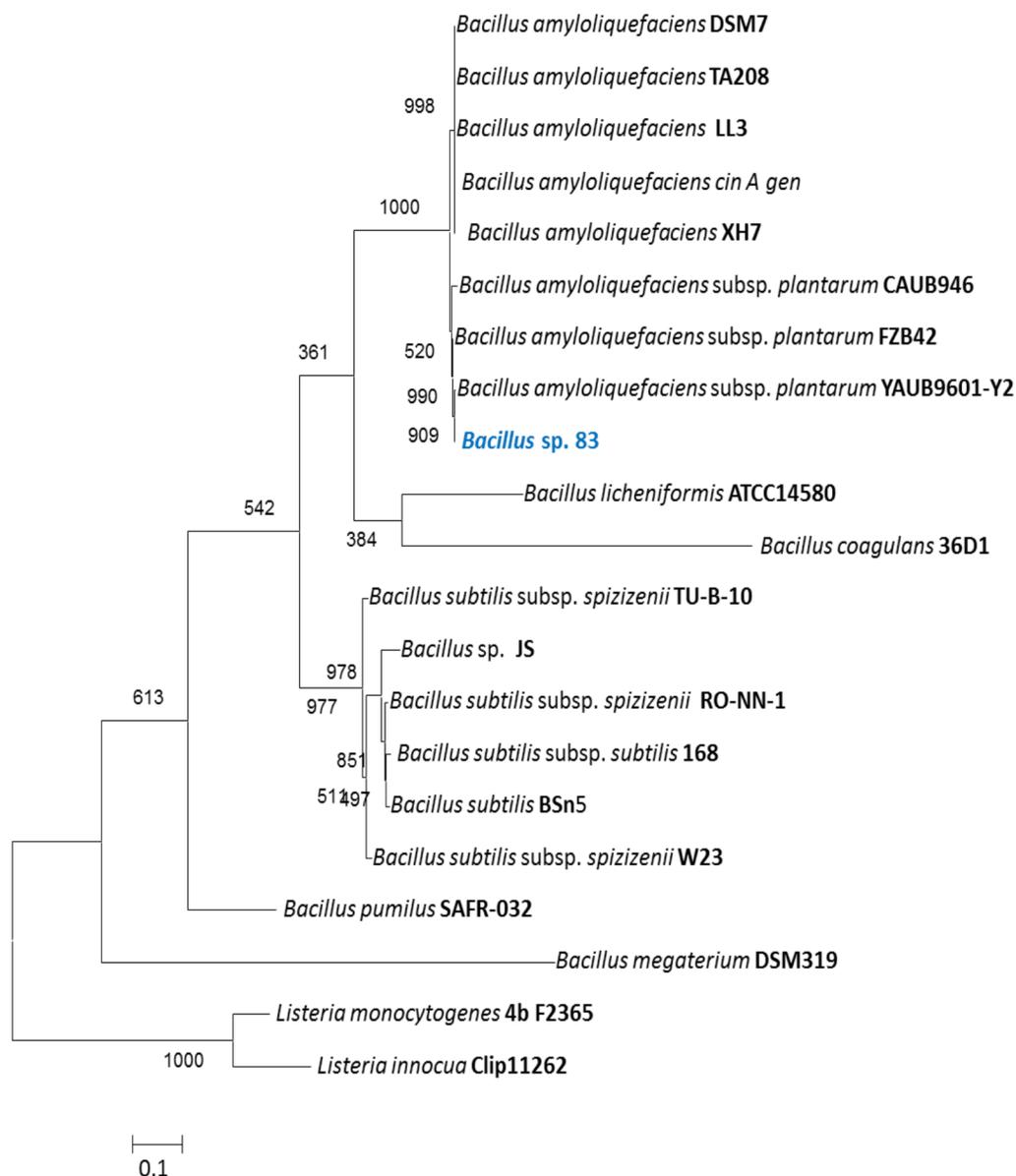


Figura 5.3. Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la secuencia del gen *recA* de *Bacillus* sp. 83, indicando la relación filogenética que existe entre la cepa y otros representantes del género *Bacillus*. En los nodos se muestran los valores *bootstrap* $\geq 50\%$ basados en 1000 repeticiones. La barra representa el 10 % de cambios entre nucleótidos de las secuencias.

5.2.2. Amplificación de genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos producidos por *Bacillus* sp. 83

Las bacterias asociadas a plantas como los *Bacillus* son conocidas por desempeñar un papel importante, ya sea al estimular su crecimiento y/o protegerla de los fitopatógenos a través de la producción de metabolitos secundarios como los antibióticos.

Anteriormente, se demostró el potencial de biocontrol de *Bacillus* sp. 83 mediante el antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* spp. Morales (2007) utilizó los metabolitos esterilizados y no esterilizados, producidos por la cepa. Observó y cuantificó la actividad antifúngica de los metabolitos sometidos al proceso de esterilización, encontrando 30 % de inhibición del hongo con los metabolitos termorresistentes producidos a las 16 h.

Posteriormente, Solís (2010) identificó y purificó, por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los metabolitos producidos por la cepa 83 que demostraron actividad antifúngica contra *Fusarium* spp. y se identificaron como iturina A y surfactina. Al menos otro metabolito que no se identificó de la fracción de los compuestos solubles termorresistentes, presentó actividad contra el fitopatógeno. El mayor porcentaje de inhibición de los metabolitos antifúngicos presentes en el caldo libre de células se encontró en las fracciones de 3 y 5 KDa, las cuales tuvieron relación con las fracciones de los estándares comerciales de iturina A y surfactina.

Los resultados encontrados por Morales (2007) y Solís (2010), concuerdan con lo publicado por Ongena y Jaques (2007) que indicaron que la naturaleza química de los compuestos de la familia de las iturinas (iturina A y C, bacilomicina D y micosubtilina) producidos por especies de *Bacillus* corresponde a los lipopéptidos antibióticos estables a altas temperaturas que mostraron fuerte control *in vitro* de hongos fitopatógenos. Otros reportes como los de Chung *et al.*, (2008) y Chen *et al.*, (2009b) han demostrado que el éxito como agentes biocontrol de algunas cepas de *Bacillus* radica principalmente en la producción de compuestos antibióticos.

En el presente trabajo, se analizó por PCR la presencia de los genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de antibióticos como surfactina, iturina y macrolactina. El producto amplificado con los oligonucleótidos Srfkn-1 y Srfkn-2, fue de 1530 pb correspondiente al gen *srfAA* involucrado en la síntesis de surfactina. La banda se observó en el agente de biocontrol *Bacillus* sp. 83, en la cepa tipo *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T, *B. amyloliquefaciens* CCGE2081 y *B. subtilis* CPA (**Figura 5.4a**). La secuencia de la banda amplificada mostró 100 % de similitud con la secuencia del gen *srfAA* que codifica

para la enzima surfactina sintetasa A de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T (No. acceso ABS72764.1 en el *GenBank*), de acuerdo al análisis *in silico* que se realizó de la secuencia.

Con respecto al gen *ituD*, los oligonucleótidos *ituD*-f e *ituD*-r, amplificaron la banda esperada de 1203 pb. Ésta se observó en *Bacillus* sp. 83, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T, *B. amyloliquefaciens* CCGE2081 y *B. subtilis* CPA (**Figura 5.4b**). El análisis de la secuencia de 1203 pb presentó similitud (100 %) con la del gen *bmyD* (codificante para una malonil-CoA transacilasa que participa en la síntesis del antibiótico bacilomicina D) de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T (No. acceso ABS74182.1) y no con la secuencia del gen *ituD* como lo reportó Hsieh (2008) cuando utilizó los mismos oligonucleótidos que se emplearon en este trabajo.

El amplicón de 1203 pb que se observó en la cepa FZB42^T, a pesar que ésta no es productora natural de los lipopéptidos iturina A y micosubtilina, podría deberse a la secuencia conservada que poseen los genes *ituD* y *bmyD* (ambos codifican para una malonil coenzima A transacilasa) involucrados en la síntesis de iturina A, bacilomicina D y micosubtilina. Los tres son integrantes de la familia de las iturinas (Koumoutsis, *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007).

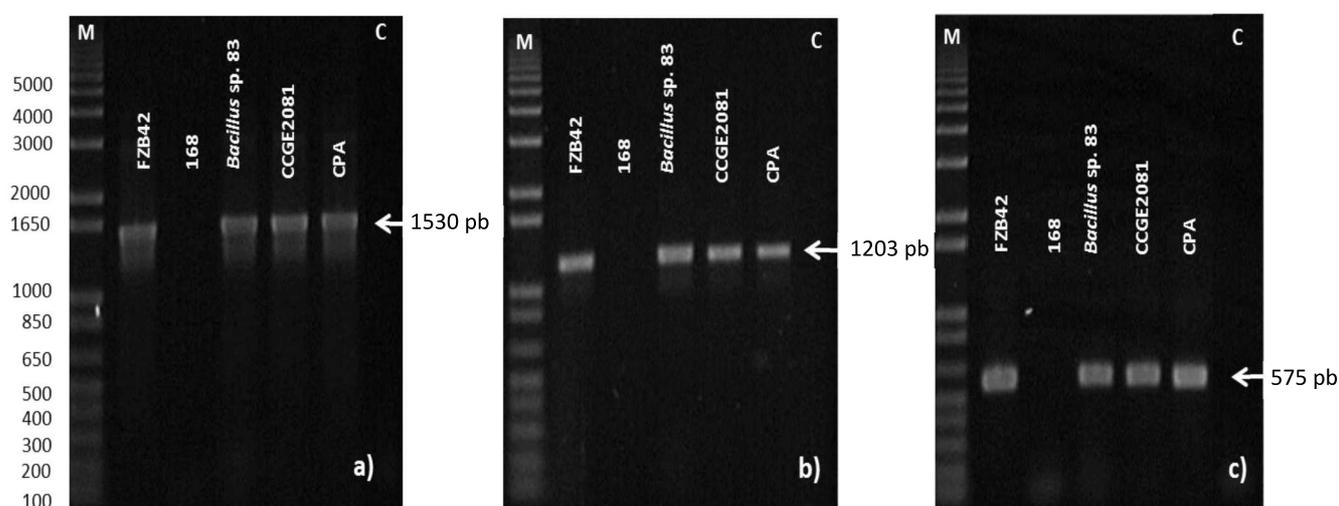


Figura 5.4. Productos de amplificación de genes involucrados en la síntesis de los antibióticos a) surfactina, b) iturina A y c) macrolactina A. (FZB42^T) *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (control positivo, productor de los tres antibióticos), (168^T) *B. subtilis* (control negativo, no productor de los tres antibióticos), (CCGE2081) *B. amyloliquefaciens*, (CPA) *B. subtilis*. (C) Control negativo (sin DNA). (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

El hecho de haber observado los amplicones de los genes *ituD* (iturina A) y *srfAA* (surfactina) en *Bacillus* sp. 83, y teniendo evidencias que la cepa produce estos lipopéptidos (como parte de los metabolitos del caldo de fermentación), sugiere que la síntesis de surfactina es un mecanismo que puede utilizar la cepa 83, gracias a la capacidad surfactante del compuesto y a su participación descubierta en la formación de *biofilms* y en el movimiento tipo *swarming* de las células de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* que le permiten la colonización de las plantas (Harshey, 2003; Bais *et al.*, 2004; Souto *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2011). La participación del lipopéptido surfactina en el control de fitopatógenos no ha sido establecida; sin embargo, se ha reportado el efecto sinérgico que tiene con la presencia del lipopéptido antibiótico iturina A, (inhibe el crecimiento de algunas bacterias Gram-positivas y de hongos) actuando de manera complementaria a nivel de las membranas biológicas de los patógenos, alterando su integridad (Maget-Dana *et al.*, 1992; Asaka y Shoda, 1996).

Los productos amplificados de los genes involucrados en la síntesis de estos lipopéptidos, nos hace confirmar que la antibiosis es uno de los mecanismos que utiliza la cepa 83 para controlar el crecimiento de *C. gloeosporioides* en el cultivo de mango, lo cual se había demostrado previamente tanto en el laboratorio como en pruebas de campo y en postcosecha.

La evidencia que menciona la participación de bacterias de la especie de *B. amyloliquefaciens* asociadas a plantas, es el genoma de la cepa FZB42^T, donde Chen *et al.*, (2007) encontraron la existencia de nueve operones con genes que codifican para enzimas participantes en la síntesis de diversos antibióticos como surfactina, fengicina, bacilomicina D, bacilisina, macrolactina y difucidina, metabolitos involucrados en la actividad de biocontrol de diversos fitopatógenos. Chen *et al.*, (2009b) evaluaron la capacidad de biocontrol de la cepa contra la bacteria *Erwinia amylovora* causante del “fuego bacteriano” en manzanas y reportaron que los antibióticos difucidina y bacilisina redujeron la enfermedad en los cultivos.

Además de los genes *bmyD* y *srfAA* amplificados en el genoma de la cepa 83, también fue posible amplificar con los oligonucleótidos mlnc-1 y mlnc-2 el fragmento esperado de 575 pb del gen *mInA*. Éste se observó en *Bacillus* sp. 83, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T, *B. amyloliquefaciens* CCGE2081 y *B. subtilis* CPA (**Figura 5.4c**). La secuencia del amplicón mostró 100 % de similitud con la secuencia del gen *mInA* de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T (No. acceso ABS73796.1 *GenBank*) que codifica para la enzima malonyl-CoA transacilasa/óxido-reductasa y participa en la síntesis del antibiótico macrolactina A.

El papel biológico que presenta el antibiótico macrolactina, no está relacionado directamente con el control de fitopatógenos; sin embargo, se han demostrado sus propiedades médicas contra bacterias

patógenas de humanos y también su actividad para inhibir el crecimiento de células cancerosas en ensayos *in vitro* (citado por Schneider *et al.*, 2007). Originalmente, la primera familia de las macrolactinas A-F fue encontrada en una bacteria del fondo del mar; posteriormente, se han ido descubriendo otros tipos de macrolactinas como: macrolactina G-M, 7-O-malonil macrolactina, 7-O-macrolactina A y macrolactina N (Schneider *et al.*, 2007).

Lo anterior puede ser una característica importante que se suma a las reportadas para *Bacillus* sp. 83, no sólo como fines de biocontrol de fitopatógenos, sino también con potencial en aplicaciones en el área farmacéutica.

En cuanto a la cepa tipo *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T que se usó como control negativo para los tres genes, se comprobó que no hubo señal de amplificación, dado que la bacteria no posee los operones con los genes responsables de la síntesis de estos compuestos (Kunst *et al.*, 1997).

5.3. Determinación de huellas genómicas de *Bacillus* sp. 83

5.3.1. Análisis y selección del fragmento RAPD

El DNA de las diferentes bacterias fue utilizado para la amplificación y obtención de un perfil genómico, con cada uno de los oligonucleótidos OPG. De los cuatro, OPG-5 y OPG-11 fueron capaces de amplificar fragmentos polimórficos con los que se generó el perfil genómico del agente de control biológico *Bacillus* sp. 83. Sin embargo, sólo OPG-11 amplificó un fragmento de aproximadamente de 1700 pb, reproducible y con posibilidad de discriminar a la cepa 83, por lo que se decidió clonar este fragmento en el vector utilizado.

Las mejores condiciones de amplificación encontradas para OPG-11 fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos que incluían: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C, y, finalmente un tiempo de 3 minutos a 72°C. La amplificación se completó con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Las **Figuras 5.5 y 5.6** muestran el perfil genómico generado para *Bacillus* sp. 83 de donde se seleccionó el fragmento de interés (1700 pb) cuando se comparó con el resto de las bacterias evaluadas.

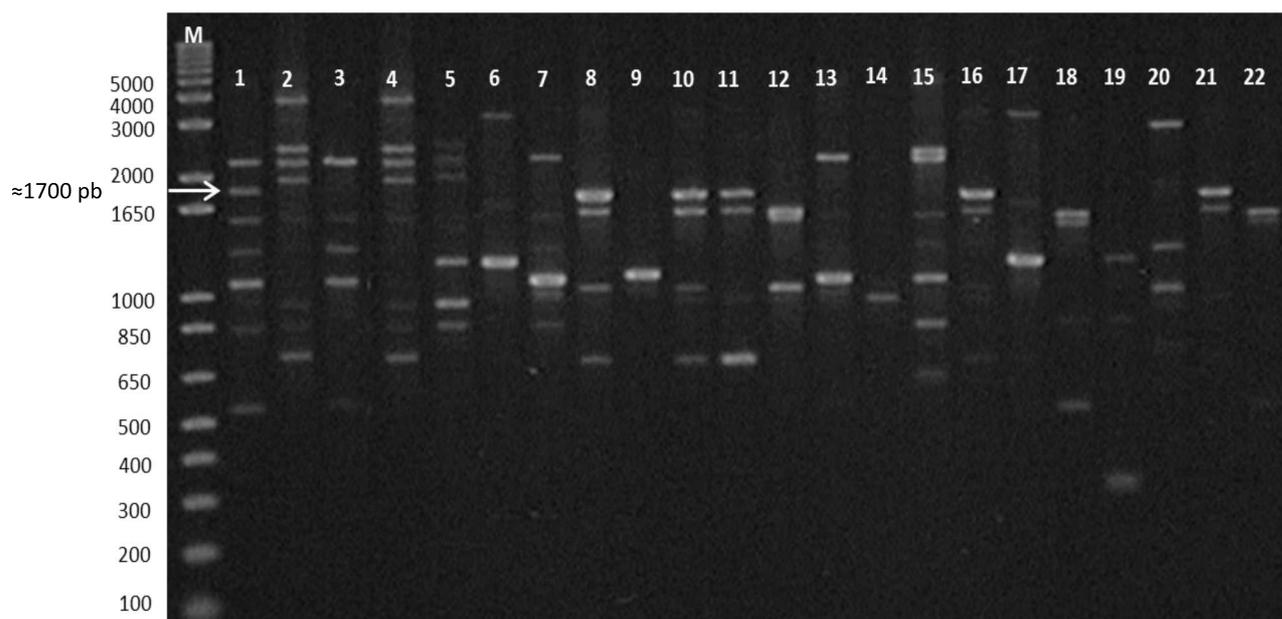


Figura 5.5. Perfiles genómicos RAPD de *Bacillus* sp. 83 y cepas de referencia obtenidos con el oligonucleótido OPG-11. (1) 83, (2) CCGE2031, (3) FZB42^T, (4) 10A18, (5) 10A3, (6) 10A1, (7) Bi 43, (8) 168^T, (9) 6633, (10) 6051, (11) 11774, (12) CCGE2066, (13) Bi28, (14) Fac. Quím1, (15) CPA, (16) 1A145, (17) 5A1, (18) 8A1, (19) 7A1, (20) 16A1, (21) 13A1, (22) 4A1. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

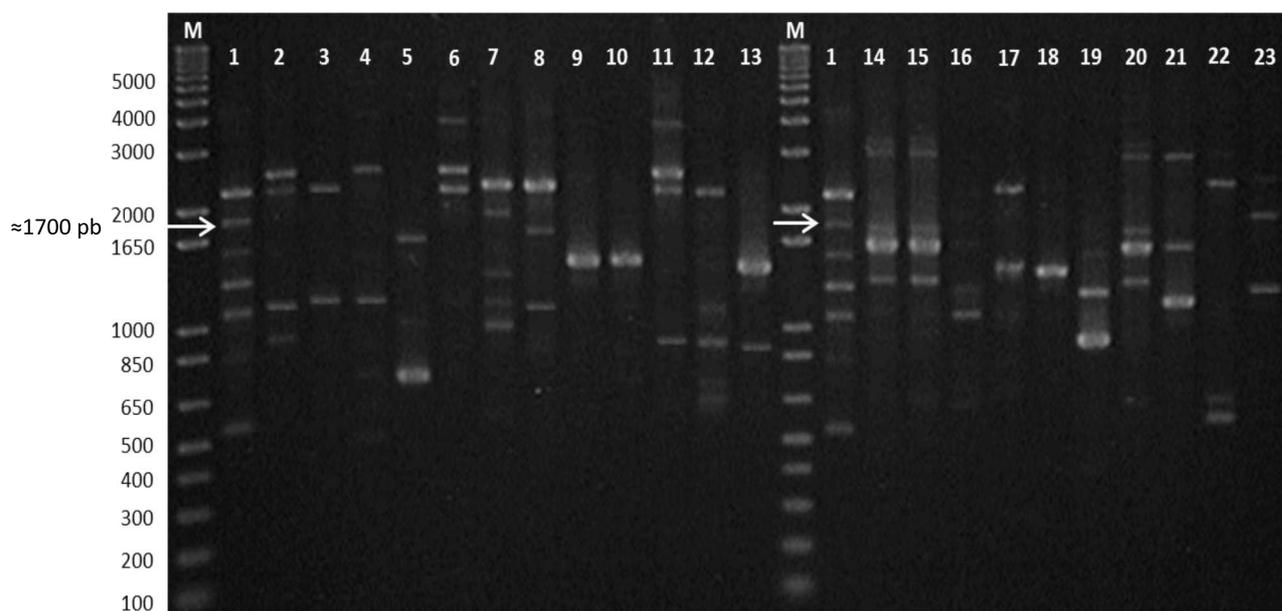


Figura 5.6. Perfiles genómicos RAPD de *Bacillus* sp. 83 y cepas aisladas de Yucatán, obtenidos con el oligonucleótido OPG-11. (1) 83, (2) TP5, (3) TP6, (4) TP14, (5) S15, (6) TP17, (7) Teya 22, (8) Teya 23, (9) S30, (10) TP31, (11) TP32, (12) S36, (13) TP34, (14) TP1, (15) TP2, (16) TP4, (17) TP9, (18) TP10, (19) TP11, (20) TP13, (21) S19, (22) Teya 21, (23) Yax 24. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

5.3.2. Análisis y selección del fragmento BOX

En las Figuras 5.7 y 5.8 se muestran los perfiles genómicos originados con el oligonucleótido BOX-A1R, que permitió diferenciar al agente de control biológico *Bacillus* sp. 83 de las cepas evaluadas, a través del fragmento amplificado de aproximadamente 250 pb. Este fragmento fue elegido para clonarse en un vector. El perfil genómico completo originado de la cepa 83 se utilizó para construir una librería de DNA.

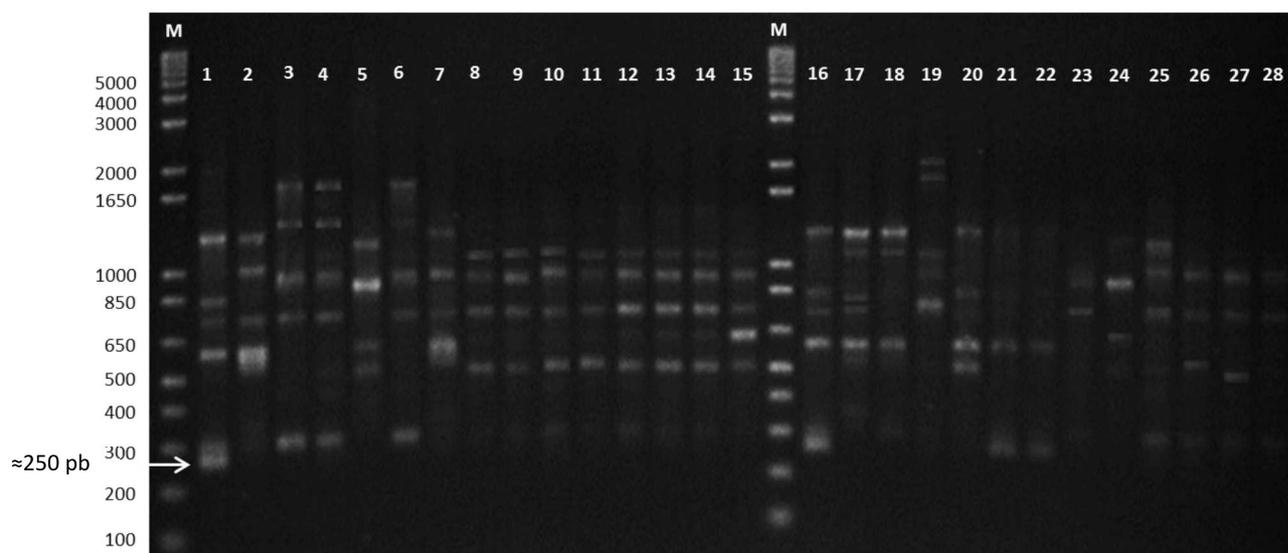


Figura 5.7. Perfiles genómicos BOX de *Bacillus* sp. 83 y cepas de referencia obtenidos con el oligonucleótido BOX-A1R. (1) 83, (2) FZB42^T, (3) 10A18, (4) 10A3, (5) 10A1, (6) CCGE2031, (7) Bi43, (8) 11774, (9) 6051, (10) 6633, (11) 1A141, (12) 1A1, (13) 168^T, (14) 1A145, (15) CCGE2066, (16) CCGE2081, (17) Bi28, (18) CPA, (19) Fac. Quím1, (20) CIAD 100, (21) CIAD 104, (22) CIAD 21, (23) 5A24, (24) 5A1, (25) 14A1, (26) 8A1, (27) 7A1, (28) Fac. Quím2. (M) Marcador de peso molecular 1 kb.

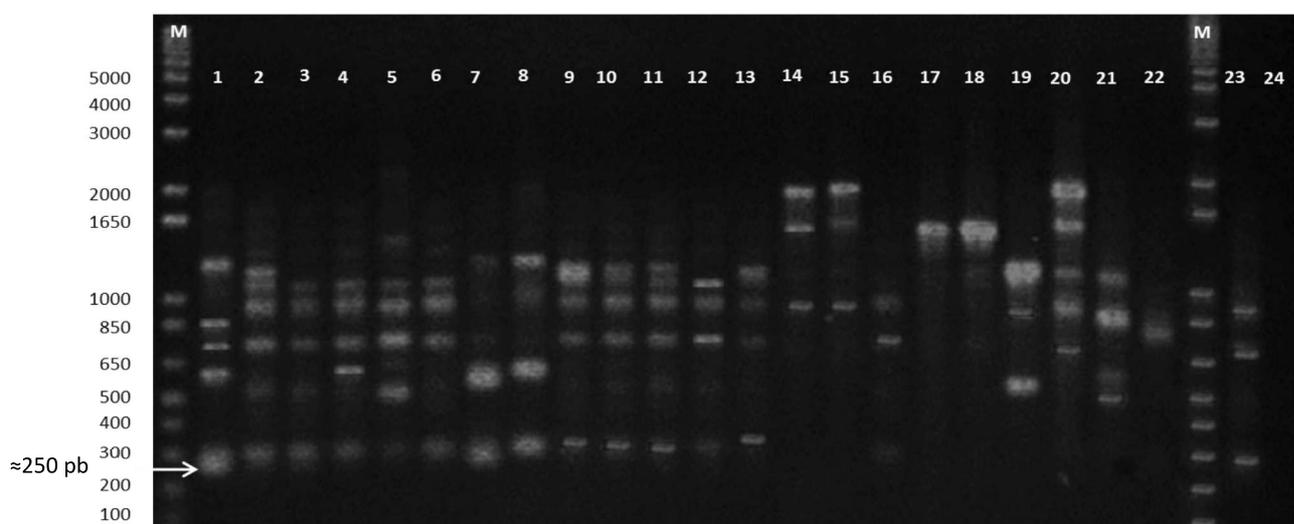


Figura 5.8. Perfiles genómicos BOX de *Bacillus* sp. 83 y cepas aisladas de Yucatán obtenidos con el oligonucleótido BOX-A1R. (1) 83, (2) TP5, (3) TP6, (4) TP14, (5) S15, (6) TP17, (7) Teya 22, (8) Teya 23, (9) S30, (10) TP31, (11) TP32, (12) S36, (13) TP34, (14) TP1, (15) TP2, (16) TP4, (17) TP9, (18) TP10, (19) TP11, (20) TP13, (21) S19, (22) Teya 21, (23) Yax 24. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

5.3.3. Análisis y selección del fragmento ERIC

Los perfiles genómicos originados con los oligonucleótidos ERIC 1R/ERIC 2 de *Bacillus* sp. 83 y el de las cepas evaluadas se ilustran en las Figuras 5.9 y 5.10. Al compararse el patrón producido de la cepa 83 con las especies evaluadas, se seleccionó el fragmento de aproximadamente 1700 pb, por haber sido reproducible y distintivo de la cepa de control biológico, con respecto al resto.

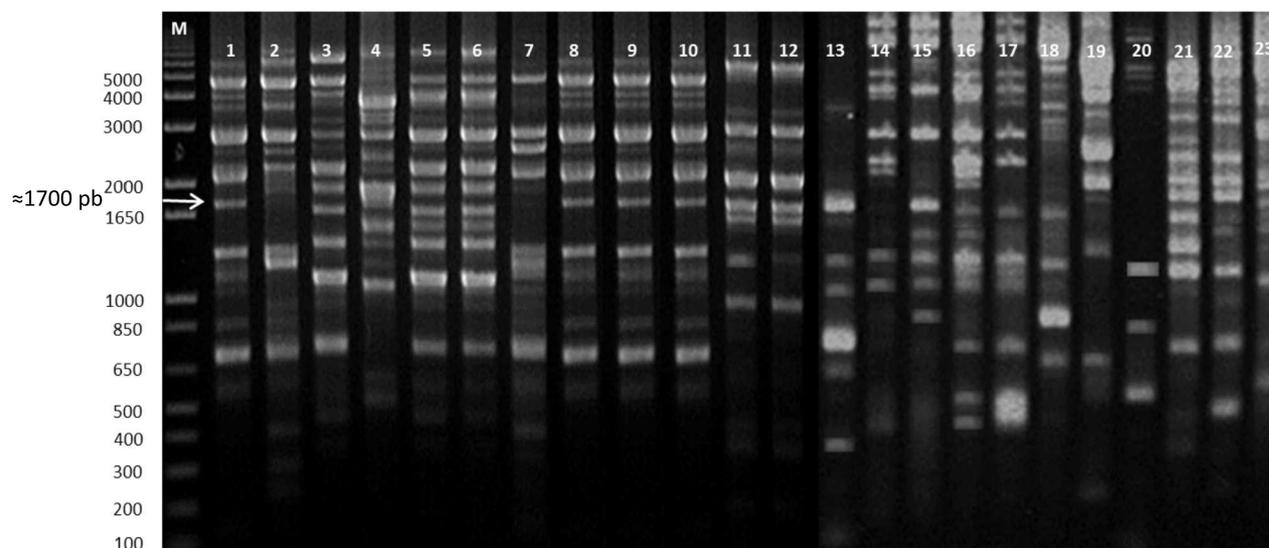


Figura 5.9. Perfiles genómicos ERIC de *Bacillus* sp. 83 y cepas de referencia obtenidos con los oligonucleótidos ERIC 1R/ERIC 2. (1) 83, (2) FZB42^T, (3) 10A3, (4) 10A1, (5) 10A18, (6) CCGE2031, (7) Bi 43, (8) CIAD 104, (9) CIAD 21, (10) CCGE2081, (11) 168^T, (12) 6051, (13) 6633, (14) 1A1, (15) 11774, (16) 1A145, (17) CCGE2066, (18) CIAD 100, (19) 5A1, (20) 8A1, (21) CFN42, (22) Mim1, (23) CH2410. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

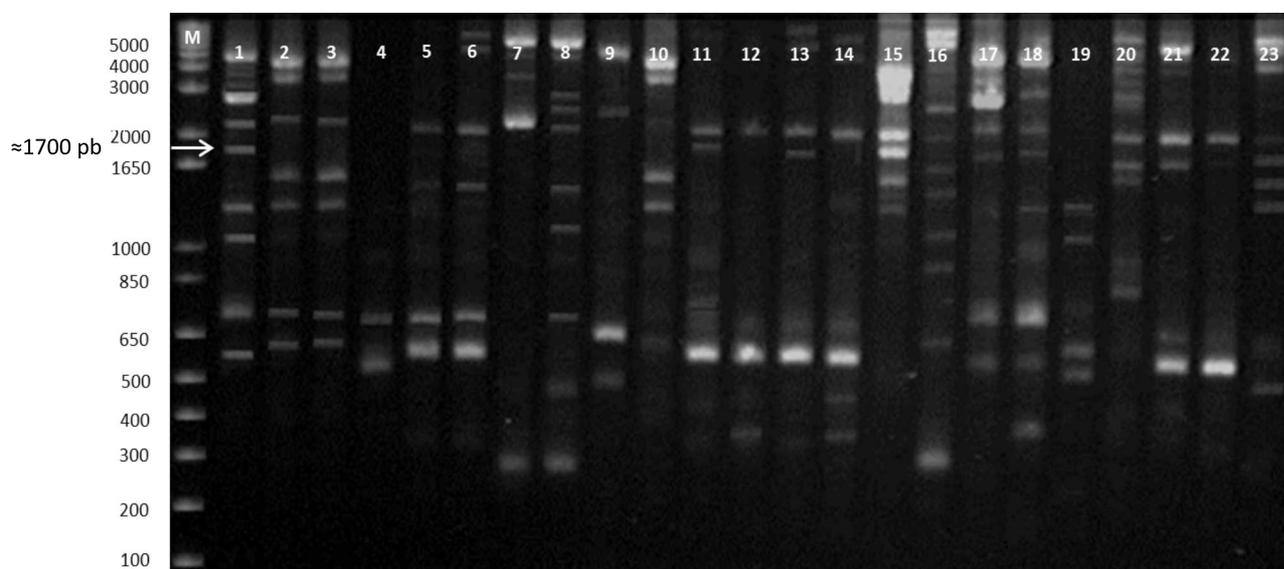


Figura 5.10. Perfiles genómicos ERIC de *Bacillus* sp. 83 y cepas aisladas de Yucatán, obtenidos con los oligonucleótidos ERIC 1R/ERIC 2. (1) 83, (2) TP1, (3) TP2, (4) TP4, (5) TP5, (6) TP6, (7) TP9, (8) TP10, (9) TP11, (10) TP13, (11) TP14, (12) TP31, (13) TP32, (14) TP34, (15) S19, (16) Teya 21, (17) Teya 22, (18) Teya 23, (19) S17, (20) S15, (21) S30, (22) S36, (23) Yax 24. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

5.4. Selección y secuenciación de fragmentos

Los fragmentos seleccionados para purificarse y clonarse en el vector pTZ57R/T fueron: el fragmento de aproximadamente 1700 pb amplificado con OPG-11 (RAPD), el fragmento de aproximadamente 1700 pb amplificado con los oligonucleótidos ERIC 1R/ERIC 2 y finalmente el fragmento amplificado de aproximadamente 250 pb con BOX-A1R (ver **Figura 5.11**). El análisis por PCR de las clonas seleccionadas con el inserto amplificado con cada técnica y los plásmidos purificados se muestran en el **Anexo 9.4**. El resultado de las secuencias de las clonas obtenidas con los fragmentos se detalla en las **Tablas 5.3 a 5.5**.

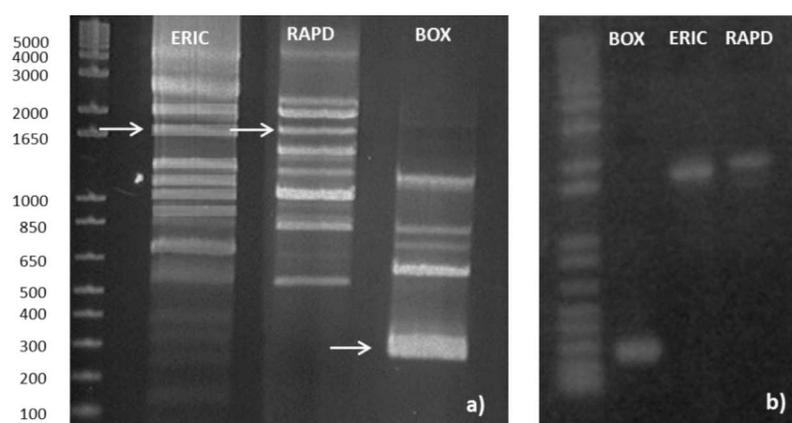


Figura 5.11. Fragmentos de DNA de *Bacillus* sp. 83 seleccionados de los perfiles ERIC, RAPD y BOX. (a) Corte de los fragmentos elegidos y (b) purificación de los fragmentos.

Con respecto al amplicón obtenido con el oligonucleótido OPG-11 en la técnica de RAPD, se obtuvieron dos clonas a partir del fragmento de 1700 pb (**Tabla 5.3**).

Tabla 5.3. Resumen de resultados del análisis de las clonas obtenidas a partir de la ligación de la banda de 1700 pb de *Bacillus* sp. 83 amplificada con OPG-11 (RAPD) que presentaron mayor similitud con genes de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T.

Clona	Longitud secuencia recuperada (pb)	Identidad (%)	Gen	Proteína	Posición del genoma de FZB42 ^T alineada con la secuencia de la clona
RAPD_2W	1644	98	<i>spaE</i>	Permeasa del sistema de transporte ABC31 de lantibióticos.	3,215,698 a 3,214,054
			<i>spaF</i>	Permeasa del sistema de transporte ABC17 de colina.	
RAPD_3W	1065	99	<i>ywoF</i>	Proteína hipotética YwoF.	3,360,476 a 3,359,411
			<i>ftsX</i>	Proteína de división celular FtsX, sistema de transporte ABC11.	

En lo que respecta a la técnica BOX-PCR se puede observar que, además de los fragmentos de 216, 219 y 250 pb que estaban contenidos en la banda principal obtenida con el oligonucleótido BOX-A1R (**Figura 5.11b**), se obtuvieron clonas representativas de todo el perfil. Las secuencias obtenidas de las clonas se resumen en la **Tabla 5.4**

Tabla 5.4. Resumen de resultados del análisis de las clonas obtenidas a partir de la ligación del perfil genómico y de la banda de 250 pb de *Bacillus* sp. 83 amplificadas con BOX-A1R (BOX-PCR) que presentaron mayor similitud con genes de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T.

Clona	Longitud secuencia (pb)	Identidad (%)	Gen	Proteína	Posición del genoma de FZB42 ^T alineada con la secuencia de la clona
D3	1193	98	<i>aldX</i>	Aldehído deshidrogenasa	3,799,114 a 3,797,922
A3	785	97	<i>yqiQ</i>	Fosfoenolpiruvato mutasa	2,379,375 a 2,378,591
B11,F3y M3	685	98	<i>baeN</i>	Proteína híbrida NRPS/PKS, síntesis de <i>bacillaene</i>	1,759,577 a 1,760,261
B5,B12,B15,C3, E3,BJ2 y J3	545	99	<i>yfnH</i> <i>yfnG</i>	Glucosa-1-fosfato citidiltransferasa y CDR-glucosa 4,6-dehidratasa	739,449 a 739,993
BOX6,BOX9, B1V BOX_6W y BOX_9W	251	96	<i>ykfB</i>	L-Ala-D/L-Glu epimerasa	1,247,560 a 1,247,310
B1B,BOX2 y BOX3	219	97	<i>yjcl</i> <i>yjcJ</i>	Cistationina β-liasa y Cistationina γ-liasa	1,162,893 a 1,162,675
BOX11 y B1M	216	98	<i>yhfS</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa	1,033,915 a 1,034,130

Es importante hacer notar las secuencias de las clonas B11, F3 y M3 obtenidas de la ligación del fragmento de 685 pb amplificado con BOX-A1R, presentaron el 98 % de identidad con la secuencia del gen *baeN* de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T, involucrado en la síntesis del antibiótico *bacillaene*. Lo anterior demuestra que dentro del genoma del agente de biocontrol *Bacillus* sp. 83, además de los genes amplificados que están involucrados en la síntesis de los antibióticos surfactina, iturina y macrolactina, también habría que agregar a éste otro antibiótico, que le confiere un mayor potencial a la cepa. En la **Figura 5.12** se muestra la secuencia obtenida del gen *baeN* de *Bacillus* sp. 83.

El antibiótico *bacillaene* fue descubierto por primer vez en 1993 por producido una cepa de *B. subtilis* ATCC55422 aislada de suelo en Japón. Se evaluó su actividad antibacteriana *in vitro* contra bacterias Gram (+), Gram (-) y levaduras patógenas de humanos, observándose inhibición sobre las bacterias, pero no contra eucariotes como *Candida* spp. Los estudios también demostraron que el agente bacteriostático actuó a nivel de la síntesis de proteínas en los procariones evaluados (Patel *et al.*, 1995).

Más tarde, Chen *et al.*, (2007) encontraron los genes responsables de la síntesis del antibiótico macrolactina en *B. amyloliquefaciens* en la cepa tipo FZB42^T.

Butcher *et al.*, (2007) mencionan que la actividad biológica del antibiótico *bacillaene* no ha sido completamente caracterizada; sin embargo, los hallazgos genéticos y metabólicos producidos por estas bacterias, sugieren que el antibiótico tiene importantes papeles biológicos.

```

1  GAATTCGCCAACAAAGCTGAATGACACTTATCAGCTTGATCTGACACCGACCGTATTTTTT
61  GAATATGCGACGATTCAAGCCCTGGCGCATCATTTAGCAGAAGACTATCAAACACAATTT
121  GCCGGCAGCACACAGCCGAAAGAAGAAAAACAAGCGGCGTAACTGATGATGGCGGCATC
181  AGACTGGCAGGGAACAAACGATTTGCAAAAAC TGCCGTACAGCCTGTT CAGACTGCGGCT
241  GAGCATAAACCGGAACCGATCGCTATTGTCGGCATGAGCGGAGTGTTTCCGAAGGCCGCA
301  AATATTGATGAGTATTGGCGCAACTTAGAAGAGGGAAAAAGATTGTATAACAGAGGTTCCG
361  GCGGATCGCTGGGACTGGCGTGAGTATTACGGTGACCCGCTTAATGAAGCCAACAAAACA
421  AATGTAAAGTGGGGCGGATTTATTGACGGAGTTGCGGATTTTGATCCGCTGTTCTTCGGA
481  ATTTACCCGCTGGAAGCCGAACAGATGGATCCCCAGCAGCGCTTGTTAATGATGTATGCG
541  TGGAAAGCGATAGAAGATGCGGGATATTCCGCTAAAAGCCTTTCCGGCACGAAAACAGGC
601  CTGTATATCGGCACGGGGAATACCGGATACGGTTCACTGTTTTCCGACCTGGATATCGGC
661  GGTGCGTCAGCCGCAAATATGAGTC

```

Figura 5.12. Secuencia de 685 pb del gen *baeN* presente en el genoma de *Bacillus* sp. 83 involucrado en la síntesis del antibiótico *bacillaene*.

Con la finalidad de conocer la naturaleza del fragmento de interés de 1700 pb obtenido con la técnica de ERIC-PCR (**Figura 5.11a**) del genoma de *Bacillus* sp. 83, se secuenciaron 8 plásmidos. Los resultados de las similitudes de las secuencias de las clonas comparadas con la base de datos del *GenBank* se detallan en la **Tabla 5.5**.

Es importante hacer notar la alta identidad (98 %) que presentó la secuencia de una de las clonas (ERD) obtenida de la ligación del fragmento de 1700 pb de *Bacillus* sp. 83 amplificado con ERIC 1R/ERIC 2, con el gen *mInG* de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T. Este gen forma parte del operón que codifica para las enzimas involucradas en la síntesis del antibiótico macrolactina A (Schneider *et al.*, 2007). Con anterioridad se identificó en el DNA genómico de la cepa 83 otro de los genes (*mInA*) (ver **Figura 5.4**) involucrado en la síntesis del mismo antibiótico con oligonucleótidos específicos.

Tabla 5.5. Resumen de resultados del análisis de las clonas obtenidas a partir de la ligación de la banda de 1700 pb de *Bacillus* sp. 83 amplificada con ERIC 1R/ERIC 2 que presentaron mayor similitud con dos especies de *B. amyloliquefaciens*.

Clona	Alineamiento con	Longitud secuencia (pb)	Identidad (%)	Gen	Proteína	Posición del genoma de referencia alineada con la secuencia de la clona
ERN,ER4W, ERI,ER7W y ER9W	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU-B946	1678	95	<i>xkdU1</i> <i>xkdU2</i> <i>yqcB</i> <i>yomR</i>	XkdU del elemento PBSX Proteína putativa YqcB Proteína no caracterizada YomR	1,280,910 a 1,282,591
	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 ^T		98	<i>yomR</i>	Proteína no caracterizada derivada del profrago SPBc2	
ERD	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 ^T	1621	98	<i>mInG</i>	MInG, síntesis del antibiótico macrolactina	1,437,084 a 1,438,701
ERIC3W	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 ^T	1115	98	<i>ybfG</i>	Proteína hipotética, función desconocida	238,679 a 238,181
ERIC2W	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 ^T	665	100	<i>ymaC</i>	Proteína homóloga que participa en replicación de fagos	1,777,139 a 1,777,621
	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU-B946		98	<i>ymaC</i> <i>ymaD</i>	Proteína homóloga que participa en replicación de fagos	1,829,341 a 1,830,942

5.5. Desarrollo del marcador para *Bacillus* sp. 83

5.5.1. Selección de secuencias y diseño de marcadores

Ninguna de las secuencias de los fragmentos seleccionados resultaron únicas de *Bacillus* sp. 83 a pesar de haber clonado fragmentos que parecieron específicos. Los resultados de las secuencias se detallan en las **Tablas 5.3 a 5.5**. Por lo que, para el diseño de los oligonucleótidos, se analizaron cada una de las secuencias resultantes considerando los criterios mencionados en la **sección 4.11.1** además de haber presentado la menor cobertura y similitud con respecto a las de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T y CAU-B946 (secuencias más cercanas con la cepa 83 de acuerdo al BLASTN). Finalmente, se eligieron las secuencias de las clonas **ERIC2W** y **ERN**, correspondientes al fragmento de 1700 pb amplificado con la técnica de ERIC-PCR (**Figura 5.11a**). Con los programas *Oligo*[®] v 7 y el *Primer 3* se diseñaron los oligonucleótidos o marcadores de las secuencias caracterizadas (marcadores SCAR), localizando en las secuencias, regiones intergénicas únicas de *Bacillus* sp. 83. Los oligonucleótidos propuestos por los programas se analizaron tomando en cuenta los alineamientos realizados.

La secuencia de 665 pb de la clona **ERIC2W** de *Bacillus* sp. 83 fue alineada con *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T y CAU-B946 (ver **Figura 5.13**), secuencias con las que presentó mayor similitud en el análisis del BLASTN. Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos (un par en una región interna de la secuencia y los dos pares restantes se diseñaron en las regiones externas). La **Figura 5.14** muestra la posición de los oligonucleótidos diseñados.

Bamyloliquefaciens_FZB42	TATCGTAGCAATGGTCTTACTAATAAGATGTGCTCATTATGCGTCAGACCCTGATCCCTCGAATTCTTCTGATACATACA	80
Bamyloliquefaciens_CAUB946	80
ERIC2W_B83	1
Bamyloliquefaciens_FZB42	CAGATTTTAAAGATTTGGCTGAACATGAAGACCCCGATGATTATCATATATCGTACAATAAGCGAAAGGGGAGCCCCGTA	160
Bamyloliquefaciens_CAUB946C.....A.....	160
ERIC2W_B83TC..G.GCG.TCC...AA.....G	24
Bamyloliquefaciens_FZB42	TTGATCATGTGCGCCGACGGAGGGAGAATTGAGGGCGGGGTGAGCGAGATCGTCCGCTCT-TTCAGAGATGATTACTCAA	239
Bamyloliquefaciens_CAUB946G.....T.....	239
ERIC2W_B83	GA...GGA.CTTGA.GTT.A..TA.A.GC...CCC...-C.TGA.....AGC..C.G.....T....	102
Bamyloliquefaciens_FZB42	CCTATCTGTTTGGGGATTAAAAACGCATGTAACAGACTCTTCATATTACGAGCACCAGGTTTCGATGAGCCTTCAGCA	319
Bamyloliquefaciens_CAUB946G.....A.....	319
ERIC2W_B83C.....G.....A.....	182
Bamyloliquefaciens_FZB42	GTCGAAAGCATTAAAGCAGCACCATTAATGTTATCGCAGTTCACGGTTATAAGGGCGACGAGAAAAATACTCTTGTGCGGAGG	399
Bamyloliquefaciens_CAUB946A.....	399
ERIC2W_B83A.....	262
Bamyloliquefaciens_FZB42	AAGCGACCGGAAGCGGGCGAAAAAATTGGTGAGAGCTCTCGAACGAAACGGATTTTCTGCAGAATTGGCAACCACAAAAA	479
Bamyloliquefaciens_CAUB946G.....A.....C.....T.....	479
ERIC2W_B83G.....T.....	342
Bamyloliquefaciens_FZB42	CCGGTCTGGCCGGGGTTGACACCGAAAAATCAATAACCAGGCGCAAACCGGGCTGAGCATACAGCTTGAGATCAGCAGA	559
Bamyloliquefaciens_CAUB946T.....	559
ERIC2W_B83	422
Bamyloliquefaciens_FZB42	GAACAGCGGAAGCGTTTTTTGATAATTTTGATTACC GCGAAAGGGAATTCACAAAAACGGAGGAATTTTACCGGTTTTGT	639
Bamyloliquefaciens_CAUB946	639
ERIC2W_B83	A.....	502
Bamyloliquefaciens_FZB42	CCGTACGATAAAAAAGAGTGATCAATCAAGAGTATTCGTAAGCTTAAAAAAGACAACAGAGTGAAAGATGAGTAAACTGA	719
Bamyloliquefaciens_CAUB946G.....C.....	719
ERIC2W_B83G.....TTCCGGCTC.GCT.C.TGTTGCATA.GA...G....	582
Bamyloliquefaciens_FZB42	AAAAAAGGAGGTTTGTCCCTTGCAAAACATCACTTTTATTTAAAGGCAAAATGGCCCGGAAATCGCAATGACGTCGGCG	799
Bamyloliquefaciens_CAUB946A.....	799
ERIC2W_B83	GCGG..T...A..CAGTGTC.A.TG...G...A-----A.....C...GAAT----GCCT..C.CT..AAGC...	650
Bamyloliquefaciens_FZB42	AT-ATTTAAAGCGGCGGGCTGGAACGGCTGTGTCCATTCCTAAGGAAATGGACGGACCCGGAGAAAGGCACAAATCTCTGA	878
Bamyloliquefaciens_CAUB946C.....	878
ERIC2W_B83	C.CGGC...A.C.....	665
Bamyloliquefaciens_FZB42	TGAAATGCTGCTTGGAGCGGCGCGACCTGTTATATTATAACGCTTGGCGCGATGATGGAAGAAGCGGCTGGATAAAG	958
Bamyloliquefaciens_CAUB946	958
ERIC2W_B83	665
Bamyloliquefaciens_FZB42	AAGATCTCATATGGAATCTGAAGGAATTGTAGACGTCACGAACGGTGTGTTACGTACCAGAAATCATTACCGCCCG	1038
Bamyloliquefaciens_CAUB946	1038
ERIC2W_B83	665
Bamyloliquefaciens_FZB42	TTTATATTATTAAGCCGGATGCAGCCGAAACGGACTTTACGCTCGCCAGGAAGTTAGCGCATAAAGCAGAGTCTCTATG	1118
Bamyloliquefaciens_CAUB946A.....G.....	1118
ERIC2W_B83	665
Bamyloliquefaciens_FZB42	TATGATTTACGAGCGGTCCAAGGAAACGTGGAGATGGAGCTTGAGGTTGAAGTAAAAGCTGCCCGCGCTTGACGAGTTT	1198
Bamyloliquefaciens_CAUB946	1198
ERIC2W_B83	665
Bamyloliquefaciens_FZB42	AAACGGTCAGCTCCGGGCGTTGATTTTTTTAGCTTTTTGAGACTTGAACGGTTCAGCAGGATGACGCCCGTGATGA	1278
Bamyloliquefaciens_CAUB946	1277
ERIC2W_B83	665
Bamyloliquefaciens_FZB42	CCAAAACAAGCCCGATCATCATTTTACTGTGTCATGGCCTCCTTAAAAACAATAAAGCCGACAATTGCCGTTAAAGCGGGT	1358
Bamyloliquefaciens_CAUB946A.....T.....AG.....T.....C.....	1357
ERIC2W_B83	665
Bamyloliquefaciens_FZB42	CCGACACCTGACCATGTGCGGTATGCGGGGATAAATCAAGGCTTTTCAATGAGAAAGCTCAAAAACATAAAAGAGGCTCC	1438
Bamyloliquefaciens_CAUB946A.....	1437
ERIC2W_B83	665
Bamyloliquefaciens_FZB42	GATTCGGCAATGACGCGGAGAGCGGGCCACAGGTGCGTAAAACCGTCCGACAGCTTCAGCATCGTCTCCGAACACTT	1518
Bamyloliquefaciens_CAUB946T.A.....T.....	1517
ERIC2W_B83	665

Figura 5.13. Alineamiento de la secuencia de la clona ERIC2W obtenida de la ligación del fragmento de 1700 pb de *Bacillus* sp. 83 con ERIC 1R/ERIC 2 con las más cercanas de *B. amyloliquefaciens*.



Figura 5.14. Secuencia de la clona ERIC2W obtenida de la ligación del fragmento de 1700 pb con ERIC 1R/ERIC 2 (ERIC-PCR) y ubicación de los tres pares de oligonucleótidos diseñados.

Con respecto a la secuencia de 1678 pb de la clona **ERN** de *Bacillus* sp. 83 (obtenida de la ligación del fragmento de 1700 pb), ésta se alineó con las secuencias de los genes *xkdU* y *yomR* de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (CAU-B946 y FZB42), *B. amyloliquefaciens* (XH7, DSM7, TA208 y LL3) y *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168^T con los cuales presentó menor cobertura y mayor similitud (**Figura 5.15**). Se diseñó un par de oligonucleótidos internos usando esta secuencia con base a su especificidad para *Bacillus* sp. 83 (**Figura 5.16**). Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados se muestran en la **Tabla 5.6**. Esto permitió la obtención de un fragmento de 221 pb específico para la cepa 83.

ERN_B83	G C A G A A T A A C G A T A T T T T C G A T T T G A C A G A T C A G C T C T T T A T T A C G A C G G C G A C A T G G G G G C T T G A C C G C T G G G A A A A A	80
Bamyloliquefaciens_CAU B946G.....C.....	80
Bamyloliquefaciens_FZB42	1
Bamyloliquefaciens_XH7C.....G.....	80
Bamyloliquefaciens_LL3C.....G.....	80
Bamyloliquefaciens_TA208C.....G.....	80
Bamyloliquefaciens_DSM7G.....	80
Bsubtilis_168A . T . C . . G . . . T . A . C G . A C . . . T C A G	67
ERN_B83	- T A T T A A A A A T A C C G C G T G A A T C A G G T G A C A C G G A G G A T A T G A G A C G G C T C A G G C T G A T T T C G A A G A T G T C G A A T A T T C C	159
Bamyloliquefaciens_CAU B946	A.....G.....C.....	160
Bamyloliquefaciens_FZB42	1
Bamyloliquefaciens_XH7G.....T.....C.....C.....	159
Bamyloliquefaciens_LL3G.....T.....C.....C.....	159
Bamyloliquefaciens_TA208G.....T.....C.....C.....	159
Bamyloliquefaciens_DSM7G.....T.....C.....C.....	159
Bsubtilis_168T . . . C G . C . . . G C . . . T . T . G . C . C . . . A T . G C . . . C . C . A C . C . . .	146
ERN_B83	G C C C A T C A C G C A T C A A G C G A T C G A A C A G G C G C T A A A C C G T T T T T T A A A A C A T C C G T C G G C T T A C G T T C G G A T G T T T C C G G	239
Bamyloliquefaciens_CAU B946A.....G.....A.....T.....	240
Bamyloliquefaciens_FZB42	1
Bamyloliquefaciens_XH7T.....C.....	239
Bamyloliquefaciens_LL3T.....C.....	239
Bamyloliquefaciens_TA208T.....C.....	239
Bamyloliquefaciens_DSM7A . T	239
Bsubtilis_168A . . . A T . C A G G . . C . T . G . . . G C . G . . A . C . . . T . A C . G . C . C C . C . . C . .	226
ERN_B83	G G C A G T A T C G T T T T A T G C C G A T A T C G A G C T T G A T G A C C T G C A G C A C A T G A A C G A G C T G A T T G A A A C G C T T G A A A A A A T C	319
Bamyloliquefaciens_CAU B946G.....	320
Bamyloliquefaciens_FZB42	1
Bamyloliquefaciens_XH7G . A A C A G T	319
Bamyloliquefaciens_LL3G . A A C A G T	319
Bamyloliquefaciens_TA208G . A A C A G T	319
Bamyloliquefaciens_DSM7G . A G T	319
Bsubtilis_168C G . A . C . A . . A . C . T . . . A . T G C T C . . G . A . A . . . C . G	306
ERN_B83	A A A C C C G C T C A T T T G G C G T A T A T A C T G A G A G C C G C A T T A A A C G A A A C A C T G G A A A T C A A A G A C C G G G T C A T T C T C A A C A A	399
Bamyloliquefaciens_CAU B946C.....	400
Bamyloliquefaciens_FZB42	1
Bamyloliquefaciens_XH7G.....	399
Bamyloliquefaciens_LL3G.....	399
Bamyloliquefaciens_TA208G.....	399
Bamyloliquefaciens_DSM7G.....	399
Bsubtilis_168C G . C . . . G . G . G . T . G . G . C G T A C A . . . C . G . T C .	386
ERN_B83	T C G G A G A T A C C G A A A A G T C A G T G A A C T G A A G G T C G G T T A T T C C G T C A C A C T C A A C A A T A A C G A G G T G G T C T T A C C A T G A T	479
Bamyloliquefaciens_CAU B946	480
Bamyloliquefaciens_FZB42	1
Bamyloliquefaciens_XH7T.....	479
Bamyloliquefaciens_LL3T.....	479
Bamyloliquefaciens_TA208T.....	479
Bamyloliquefaciens_DSM7T.....	479
Bsubtilis_168C . C C . C . . . G . C T . . . T . T . . . C . T T . A . T	466
ERN_B83	A T C A G C C G C A T A C A G A C A G C G T G C C G C A G C G A T C T G A A A A - C A G G A T C A C A A A A G T G C T G T T A A A C G G C A A A G A A A C A C	558
Bamyloliquefaciens_CAU B946T.....A.....T.....	560
Bamyloliquefaciens_FZB42	1
Bamyloliquefaciens_XH7A.....	559
Bamyloliquefaciens_LL3A.....	559
Bamyloliquefaciens_TA208A.....	559
Bamyloliquefaciens_DSM7A.....	559
Bsubtilis_168T . . A . A T G . A . C A . A . G . T . . . A . G . . A . . G A T C . C . . . C . C . . . C . A G	546
ERN_B83	C G A T T G C G G A T A T T T C C G T A A A A G A A G C C C A G T C A C C G T T C T C A C A C G C A G G G A A G A A G G C A T C A A A C A T A T T G A A A C C	638
Bamyloliquefaciens_CAU B946C.....T.....G.....A.....G.....C.....	640
Bamyloliquefaciens_FZB42T . C G G . T . . G A . A . T . A T T G . A A T G . . A A G . A C C C G C G G A . . . C C G . C G T	59
Bamyloliquefaciens_XH7C T T	639
Bamyloliquefaciens_LL3C T T	639
Bamyloliquefaciens_TA208C T T	639
Bamyloliquefaciens_DSM7C T T	639
Bsubtilis_168A A . A . T A . G C . C G . A T G . C . G T . G A G . . A A A C . T . G . . . A G G	626
ERN_B83	G T G C A G A T G C T T G A C G A A A C A G G A A G C G T C A T C A C A G A A C G A A A A A C A A A T T T A G A T C T C A G C A A T A A C A G A A C G C T G G A	718
Bamyloliquefaciens_CAU B946T.....A.....T.....	720
Bamyloliquefaciens_FZB42C . A . . T . A T A . C . . C G . C . C . . G G . A . T . C C . T . T A C G T C C G . A G . T . . C . . A G . . . T . T . G	134
Bamyloliquefaciens_XH7G.....	719
Bamyloliquefaciens_LL3G.....	719
Bamyloliquefaciens_TA208G.....	719
Bamyloliquefaciens_DSM7G.....	719
Bsubtilis_168A . A . T T G C T G . C . A T . G G A . . . G . T G . C C . G . C G . . . G . A . . . A . C . .	706
ERN_B83	T T T A A G A T T T A C C T T T G A G G T G G T G T A A C G A T G G C T T A C G A A G A A A A A C A G A C T G G C T T C C G G A C G A T C C G A T C A A T G A	798
Bamyloliquefaciens_CAU B946	800
Bamyloliquefaciens_FZB42C G G G G A G C C A . A . A . A A A C . G A T G C A . G C . C T C . . C . . . G T T	184
Bamyloliquefaciens_XH7	799
Bamyloliquefaciens_LL3	799
Bamyloliquefaciens_TA208	799
Bamyloliquefaciens_DSM7	799
Bsubtilis_168C T A C A C . A . . . C	786
ERN_B83	A G A C G A C G T C A A C C G T G G G A A A A A G G C A T A A A A G A C G C C C A C A A G G A T C T G G C G G C C C A T A A A A A C G A C A T G A A C A A C C	878
Bamyloliquefaciens_CAU B946T.....C.....T.....	880
Bamyloliquefaciens_FZB42	184
Bamyloliquefaciens_XH7	879
Bamyloliquefaciens_LL3	879
Bamyloliquefaciens_TA208	879
Bamyloliquefaciens_DSM7A.....	879
Bsubtilis_168T A C C . C . . T . . . C	866

Figura 5.15. Alineamiento de la secuencia de 1678 pb de la clona ERN obtenida del fragmento de 1700 pb de *Bacillus* sp. 83 con ERIC-PCR, con las más cercanas de *B. amyloliquefaciens*.

Continúa en la siguiente página.

ERN_B83	C G C A C A A A A C G A C A A A G G C G C A A A T C G G C C T C G G A A A C G T G G A C A A C G T C C A G C A G G C A G C A A A A A A A G A T T T C G A T C A G	958
Bamyloliquefaciens_CAU B946 T	960
Bamyloliquefaciens_FZB42 G	184
Bamyloliquefaciens_XH7 T . C . G .	959
Bamyloliquefaciens_LL3	959
Bamyloliquefaciens_TA208 A	959
Bamyloliquefaciens_DSM7 C	959
Bsubtilis_168	. C C . A G . G . G . T T . T . G	924
ERN_B83	C A C A A T C A A G A T C A G G A C C G G C A C T T G A C G A A A G A A G A G C G C C A G A A G T G G G A T A A C G G G C A G - T G T C T A A A A T G A C A A A	1037
Bamyloliquefaciens_CAU B946 T	1040
Bamyloliquefaciens_FZB42 T G	184
Bamyloliquefaciens_XH7 A	1039
Bamyloliquefaciens_LL3 C	1039
Bamyloliquefaciens_TA208 C	1039
Bamyloliquefaciens_DSM7 T G	1021
Bsubtilis_168	924
ERN_B83	A G A T A A T G G C T C C G C T T T A T T G A T A T C T C T G A C G G A C A G G A T T T T C A T C A G A C C G C T G C C A G C C A A A A T A A G A C C T T T A	1117
Bamyloliquefaciens_CAU B946 G	1120
Bamyloliquefaciens_FZB42 A	184
Bamyloliquefaciens_XH7 G	1119
Bamyloliquefaciens_LL3 T T	1119
Bamyloliquefaciens_TA208 A	1119
Bamyloliquefaciens_DSM7 G	1021
Bsubtilis_168 T T	924
ERN_B83	C T T C C T C - A C A G C A A C A A C G G G A A T A A A T A C T C C G C C T C A G C A G A C A G A C G G T A T T T A C C T A T A T T C T T C A A A G A A T A A C	1196
Bamyloliquefaciens_CAU B946 T A G T G C	1200
Bamyloliquefaciens_FZB42 C C A . A . C . T G A T G	184
Bamyloliquefaciens_XH7 T G	1199
Bamyloliquefaciens_LL3 T G	1199
Bamyloliquefaciens_TA208 T G	1199
Bamyloliquefaciens_DSM7 T G	1021
Bsubtilis_168	924
ERN_B83	G G G G A G G C G C C G C T T T T T C A A A C G A T G G A G G A T T T T G G A G A A A A A C A C T G G A A A A C G G C A T T T G G A C T G A A T G G A T A C C	1276
Bamyloliquefaciens_CAU B946 A	1280
Bamyloliquefaciens_FZB42 C G . T . C . G G A C G G	184
Bamyloliquefaciens_XH7	1279
Bamyloliquefaciens_LL3	1279
Bamyloliquefaciens_TA208	1279
Bamyloliquefaciens_DSM7	1021
Bsubtilis_168	924
ERN_B83	G T A T G A A A C A G C T G C C G G A G C A C A A G C A A A A G T A A A T G A G C A T G C C A A A A A A C A G A C A T T C A T G T A A C C A A G T C T G A C A	1356
Bamyloliquefaciens_CAU B946 A . T	1360
Bamyloliquefaciens_FZB42 G . C T C	184
Bamyloliquefaciens_XH7 C	1359
Bamyloliquefaciens_LL3 C	1359
Bamyloliquefaciens_TA208 C	1359
Bamyloliquefaciens_DSM7	1021
Bsubtilis_168	924
ERN_B83	A A G A C A A A T G G A A T G C A G G G C A G T T A T T C A A T C T G A C T G A C A A T G G C G G G A A T G C T A A A A C G G T A A C G G A A A C A A A C T T A	1436
Bamyloliquefaciens_CAU B946 A	1440
Bamyloliquefaciens_FZB42	184
Bamyloliquefaciens_XH7	1384
Bamyloliquefaciens_LL3	1384
Bamyloliquefaciens_TA208	1384
Bamyloliquefaciens_DSM7	1021
Bsubtilis_168	924
ERN_B83	G A C A A T A T A A A A A C G T C C G G T A T C T A C T A T A T A T C A G T T C A G C A T A C G G A A A A T A A G C C T G C G G A A T A C G G A C A A T T A A T	1516
Bamyloliquefaciens_CAU B946 C	1520
Bamyloliquefaciens_FZB42	184
Bamyloliquefaciens_XH7	1384
Bamyloliquefaciens_LL3	1384
Bamyloliquefaciens_TA208	1384
Bamyloliquefaciens_DSM7	1021
Bsubtilis_168	924
ERN_B83	T G T A A T G C A A A G A A C C C G C G G A G C A T C A C C G A C G T T T G T C C A A A T G T T T A T A G A C A C A G C G A C C G C C G G A A A T C C C A T A T	1596
Bamyloliquefaciens_CAU B946 C	1600
Bamyloliquefaciens_FZB42 T	184
Bamyloliquefaciens_XH7	1384
Bamyloliquefaciens_LL3	1384
Bamyloliquefaciens_TA208	1384
Bamyloliquefaciens_DSM7	1021
Bsubtilis_168	924
ERN_B83	A C G T C C G A A G T T T C A G C A C T A A A G G C G T T T G G T C G G A G T G G A G C C A A A G A G A A A C A G A T G C A G G C T C T C A A G C A A A A G T A	1676
Bamyloliquefaciens_CAU B946 A	1680
Bamyloliquefaciens_FZB42 A	184
Bamyloliquefaciens_XH7 C A	1384
Bamyloliquefaciens_LL3 T	1384
Bamyloliquefaciens_TA208	1384
Bamyloliquefaciens_DSM7	1021
Bsubtilis_168	924
ERN_B83	G A	1678
Bamyloliquefaciens_CAU B946	..	1682
Bamyloliquefaciens_FZB42	--	184
Bamyloliquefaciens_XH7	--	1384
Bamyloliquefaciens_LL3	--	1384
Bamyloliquefaciens_TA208	--	1384
Bamyloliquefaciens_DSM7	--	1021
Bsubtilis_168	--	924

Figura 5.15. Continúa

```

1  GCAGAATAACGATATTTTCGATTTGACAGATCAGCTCTTTATTACGACGGCGACATGGGGGCTTGACCGC
71  TGGGAAAAAATATTTAAAAATACCGCGTGAATCAGGTGACACGGAGGATATGAGACGGCTCAGGCTGATTT
141  CGAAGATGTCTGAATATTCGCCCCATCACGCATCAAGCGATCGAACAGGCGCTAAACCGTTTTTTAAAAACA
211  TCCGTCGGCTTACGTTCCGGATGTTTTCCGGGGCAGTATCGTTTTTATGCCGATATCGAGCTTGATGACCTG
281  CAGCACATGAACGAGCTGATTGAAACGCTTGAAAAAATCAAACCCGCTCATTGGCGTATATACTGAGAG
351  CCGCATTAACGAAACACTGGAAATCAAAGACCGGGTCATTCTCAACAATCGGAGATACCGAAAAGTCAG
421  TGAAC TGAAGGTCGGTTATTCCGTCACACTCAACAATAACGAGGTGGTCTTACCATGATATCAGCCGCAT
491  ACAGACAGCGTGCCGCAGCCGATCTGAAAAACAGGATCACAAAAGTGCTGTTAAACGGCAAAGAAACACCG
561  ATTGCGGATATTTCCGTAAAAGAAGCCGCAGTCCCGTTCTCACACGCAGGGAAGAAGGCATCAAACATA
631  TTGAAACCGTGCAGATGCTTGACGAAACAGGAAGCGTCATCACAGAACGAAAAACAATTTAGATCTCAG
701  CAATAACAGAACGCTGGATTTAAGATTTACCTTTGAGGTGGTGTAAACGATGGCTTACGAAGAAAAAACAG
771  ACTGGCTTCCGGACGATCCGATCAATGAAGACGACGTCAACCGCTGGGAAAAAGGCATAAAAGACGCCCA
841  CAAGGATCTGGCGGCCATAAAAAACGACATGAACAACCCGCACAAAACGACAAAGGCGCAAATCGGCCCTC
911  GGAAACGTGGACAACGTCCAGCAGGCAGCAAAAAAAGATTTTCGATCAGCACAAATCAAGATCAGGACCGGC
981  ACTTGACGAAAGAAGAGCGCCAGAAGTGGGATAACGGGCAGTGCTCAAAATGACAAAAGATAATGGCTCC
1051  GCTTTTATTGATATCTCTGACGGACAGGATTTTCATCAGACCGCTGCCAGCCAAAATAAGACCTTTACTT
1121  CCTCACAGCAACAACGGGAATAAATACTCCGCCCTCAGCAGACAGACGGTATTTACCTATATTCTTCAAAG
1191  AATAACGGGGAGGCGGCCGCTTTTTCAAACGATGGAGGATTTTGGAGAAAAACACTGGAAAACGGCATT
1261  GGACTGAATGGATACCGTATGAAACAGCTGCCGGAGCACAAGCAAAAAGTAAATGAGCATGCCAAAAAAAC
1331  AGACATTCATGTAACCAAGTCTGACAAAAGACAAAATGGAATGCAGGGCAGTTATTCAATCTGACTGACAAT
1401  GGCGGGAATGCTAAAACGGTAACGGAAACAAACTTAGACAATATAAAAACGTCGGTATCTACTATATAT
1471  CAGTTCAGCATAACGGAAAATAAGCCTGCGGAATACGGACAATTAATTGTAATGCAAAGAACC CGCGGAGC
1541  ATCACCGACGTTTGTCAAATGTTTATAGACACAGCGACCGCCGGAAATCCCATATACGTCCGAAGTTTC
1611  AGCACTAAAGGCGTTTGGTCGGAGTGGAGCCAAAGAGAAACAGATGCAGGCTCTCAAGCAAAGTAGA

```

Figura 5.16. Secuencia de 1678 pb de la clona ERN obtenida de la ligación del fragmento de 1700 pb con ERIC-PCR y ubicación del par de oligonucleótidos diseñados **CBam83F/****CBam83R** (subrayados).

Bacillus sp. 83, al igual que otros agentes de control biológico aplicados en el ambiente, tiene que enfrentarse a múltiples factores tanto ambientales como los impuestos por el hospedero. La habilidad para colonizar y sobrevivir en un ambiente dado puede variar entre cepas, inclusive de la misma especie. Además, es todo un reto para los ACB poder colonizar de forma exitosa las superficies vegetales, debido a la competencia no sólo con el patógeno presente en la planta, sino también con los microorganismos endémicos de la misma (Van Veen *et al.*, 1997). Por lo anterior, algunos reportes indican que un método de

monitoreo específico para el agente de control biológico podría ser útil para conocer su capacidad de colonización a través del tamaño de población y a la vez que sea evaluada en períodos de tiempo que quizá puedan involucrar etapas importantes del cultivo agrícola.

Fravel *et al.*, (2005) han enfatizado que entre más conocimiento se tenga de la ecología de un agente de biocontrol, más argumentos se tendrán para entender los problemas o factores que podrían estar afectando la pobre colonización y persistencia, trabajar en ellos y saber cómo aprovecharlos, cómo y cuándo aplicar el ACB, y predecir situaciones en las cuales el microorganismo no desarrollaría su o sus mecanismos de control.

En este estudio, se diseñaron cuatro pares oligonucleótidos para la identificación específica de *Bacillus* sp. 83 como agente de control biológico presente en el formulado *Fungifree AB*® y su posterior uso en el monitoreo a nivel de campo. Para el método desarrollado, se utilizaron las ventajas que han presentado los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos por la reacción de PCR, además de no requerir un conocimiento previo del genoma de la cepa, como era el caso de la cepa 83 de la cual no se tienen reportes de la composición de su genoma.

Tabla 5.6. Marcadores de secuencias caracterizadas diseñados para *Bacillus* sp. 83.

Nombre	Secuencia (5'→3')
CBam83F	CGG CCG CTT TTT CAA ACG ATG GAG
CBam83R	CGT TAC CGT TTT AGC ATT CCC GCC
ERIC2WA-f	GAG ATG GAG CTT GAG GTT GAA G
ERIC2WA-r	GAA CTT GGT GCT CGT AAT ATG AA
ERIC2WB-f	TCA CGA GCG GTC CAA GGA AAC G
ERIC2WB-r	GAA TAA TCA TCC CGG AGC TGA GCG G
ERIC2WC-f	CGC AAA CCG GGC TGA GCA TAC A
ERIC2WC-r	AAC ATG GAG CGG AGC CGG AAA AG

El uso de marcadores SCAR u oligonucleótidos basados en secuencias caracterizadas de los fragmentos amplificados con las técnicas de **BOX**, **ERIC** y **RAPD**, es uno de los elementos más utilizados para la identificación específica de cepas de control biológico como lo han señalado Pujol *et al.*, (2005), Rubio *et al.*,

(2005) y Felici *et al.*, (2008), por tratarse de secuencias que están presentes en el genoma y no emplean herramientas de DNA recombinante, permitiendo así una simple y específica identificación mediante PCR.

Desde su desarrollo en 1990 (Williams *et al.*, 1990) **RAPD** es una de las técnicas más usadas para detectar polimorfismos en el genoma de agentes de control biológico. Sin embargo, también se han utilizado los métodos basados en secuencias conservadas como **BOX** y **ERIC**, aunque ésta última no es ampliamente usada como **RAPD** y **BOX** para visualizar perfiles genómicos de ACB y diseñar a partir de los productos, marcadores específicos.

Edel-Hermann *et al.*, (2011) utilizaron la técnica de ERIC-PCR para diseñar un marcador específico del agente de control biológico *F. oxysporum* Fo47 (no fitopatógeno) para el control del patógeno *F. oxysporum* (denominado como *formae speciales*) causante de la marchitez de las raíces en varios cultivos agrícolas. Compararon los patrones genómicos originados con la técnica de ERIC y encontraron un fragmento específico para el ACB evaluado que usaron para diseñar oligonucleótidos específicos que permitieron monitorearlo y cuantificarlo cuando fue inoculado en raíces de tomate.

El desarrollo de un marcador específico para un ACB, depende principalmente en encontrar secuencias únicas que lo diferencien de los demás microorganismos. Felici *et al.*, (2008) han mencionado que entre más heterogeneidad genética tenga un agente de control biológico, será más fácil encontrar un marcador específico para identificarlo. Sin embargo, con el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83 se tuvieron varias dificultades para poder encontrar un marcador específico, dado que no presentaba tal heterogeneidad con respecto a las cepas evaluadas, de acuerdo a los perfiles obtenidos y a las secuencias de los fragmentos amplificados.

5.5.2. Evaluación de los marcadores diseñados para *Bacillus* sp. 83

Las condiciones de PCR óptimas en las que fueron evaluados los oligonucleótidos diseñados, fueron las citadas en la **Tabla 4.12** (pág. 33), obteniendo mejor señal de amplificación con la temperatura de alineamiento a 68°C, logrando de esta forma, condiciones más robustas que minimizaron la posibilidad de hibridaciones no específicas con el DNA de la cepa 83.

El análisis de la evaluación de los cuatro pares de marcadores con el DNA de la cepa 83 y cepas de *B. amyloliquefaciens* (de la **Tabla 4.1**, pág. 22), mostró que sólo el par de oligonucleótidos **CBam83F/CBam83R** (diseñado a partir de la secuencia de 1678 pb de la clona ERN) amplificaron un sólo y específico fragmento de la longitud esperada de 221 pb en *Bacillus* sp. 83, de acuerdo a la predicción propuesta por el programa *Primer 3*. Mientras tanto, los marcadores **ERIC2WA-f/ERIC2WA-r**, **ERIC2WB-f/ERIC2WB-r** y **ERIC2WC-**

A pesar que la secuencia de 221 pb presentó similitud y la mayor cobertura con el gen *yomR* de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU-B946 reportado en la base de datos (como lo muestra la tabla anterior), no se consideró que pudiera interferir en la especificidad, dado al alineamiento realizado de la secuencia específica de la cepa 83 con la reportada. En cambio, se evaluaron los marcadores **CBam83F/CBam83R** realizando un BLAST contra las secuencias de los genomas de bacterias disponibles en la base de datos del *GenBank* y de acuerdo al análisis realizado en la página del NCBI, los marcadores no fueron capaces de amplificar alguna secuencia en las bacterias. Lo anterior, ya se había observado en la **Figura 5.17** con la ausencia de señal del fragmento en la cepa FZB42^T (genoma completo disponible en el *GenBank*).

5.5.3. Especificidad de los marcadores

Dado que los marcadores **CBam83F/CBam83R** fueron los únicos capaces de amplificar un único y específico fragmento de 221 pb del gen *yomR* para el agente de biocontrol *Bacillus* sp. 83, se utilizaron para ser evaluados en el ensayo de especificidad con el resto de las bacterias.

La especificidad de los oligonucleótidos fue evaluada contra el DNA de un conjunto de cepas de referencia, bacterias aisladas de muestras de suelo de plantaciones de papaya en municipios de Yucatán y de DNA de células vegetativas y de esporas de la cepa 83 que fueron asperjadas en hojas de papayo. Los resultados indicaron que los oligonucleótidos fueron altamente específicos para amplificar el fragmento de 221 pb en el genoma de *Bacillus* sp. 83, mientras que en el resto de las bacterias y en los aislados de campo no se observó la banda (**Figuras 5.18 y 5.19**).

Es importante mencionar que se observó amplificación en las cepas asignadas como *B. subtilis* CIAD 21, *B. subtilis* CIAD 104 y *B. amyloliquefaciens* CCGE2081 (ver **Anexo 9.5**). Las cepas CIAD 21 y CIAD 104 fueron aisladas en el mismo período en el que se aisló a *Bacillus* sp. 83 y fueron guardadas como parte de la colección del cepario del laboratorio. Los resultados de morfología parecida, secuencia del gen *recA* y perfiles genómicos semejantes con *Bacillus* sp. 83, sugieren que se puede tratar de la misma bacteria, pero asignada con nombres diferentes, por lo que no era de sorprender que se encontrara el fragmento de 221 pb en ellas. En cuanto a la cepa CCGE2081, la cual también presentó perfiles genómicos y morfología parecidos a *Bacillus* sp. 83, es endófito de las raíces de frijol, identificada como *B. amyloliquefaciens* a través de la secuencia del 16S rDNA. El resultado anterior sorprendió por haberse encontrado una cepa muy parecida a la 83, aislada del interior de semillas de frijol presentes en la región de los Tuxtlas, Veracruz, y se puede pensar en lo cosmopolita que pueden llegar a ser las especies de *Bacillus* al estar presentes en diversas regiones geográficas.

f/ERIC2WC-r amplificaron fragmentos de diferente longitud, tanto en *Bacillus* sp. 83, como en todas las cepas evaluadas (ver **Figura 5.17**). Esto último quizá se debió a la secuencia origen de los marcadores ERIC2W, que presentó más similitud con las reportadas en la base de datos, que la secuencia que originó los marcadores **CBam83F/CBam83R**.

La banda de 221 pb que se observó sólo en el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83, amplificada con los marcadores **CBam83F/CBam83R** fue secuenciada y analizada contra la base de datos mediante el algoritmo BLASTN. La similitud de la secuencia de 221 pb encontrada con las cepas de *B. amyloliquefaciens* reportadas en el *GenBank* se muestra en la **Tabla 5.7**.

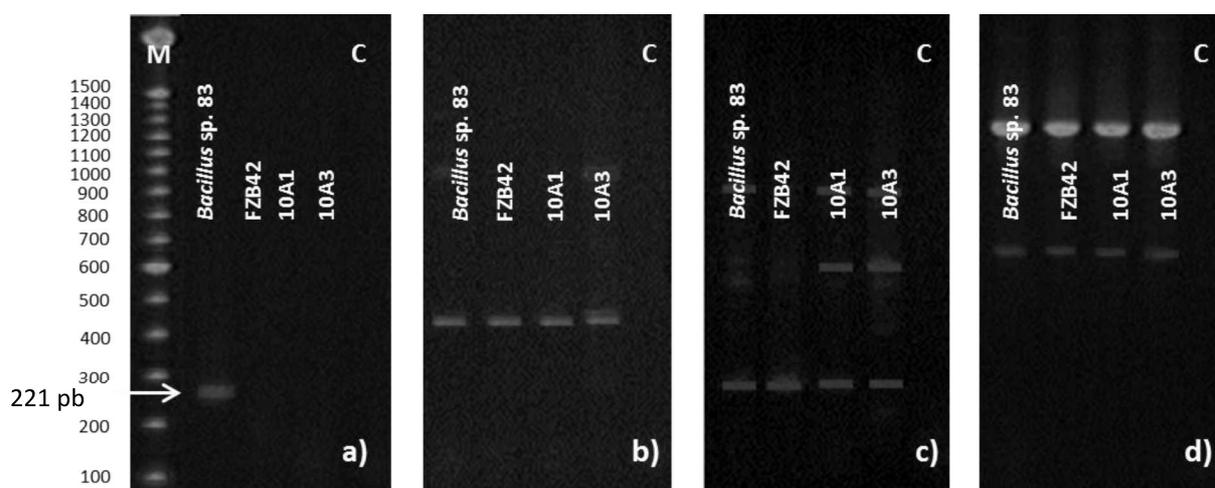


Figura 5.17. Evaluación de la especificidad de los cuatro pares de marcadores diseñados para *Bacillus* sp. 83. (a) CBam83F/CBam83R, (b) ERIC2WA-f/ERIC2WA-r, (c) ERIC2WB-f/ERIC2WB-r y (d) ERIC2WC-f/ERIC2WC-r. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb.

Tabla 5.7. Análisis del BLASTN de la secuencia de 221 pb amplificada con los marcadores CBam83F/CBam83R en *Bacillus* sp. 83.

Cepa	Microorganismo	% Identidad	% Cobertura	Valor E	Gen	Proteína	Tamaño del gen (pb)
XH7	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99	80	2e-85	<i>xkdV</i>	Proteína hipotética putativa PBSX	1764
LL3	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99	80	2e-85	LL3_01375	Proteína hipotética	1764
TA208	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99	80	2e-85	<i>yomR1</i>	Proteína hipotética	1764
CAU-B946	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	92	99	4e-82	<i>yomR</i>	Proteína no caracterizada yomR derivada del fago SPBc2	1623

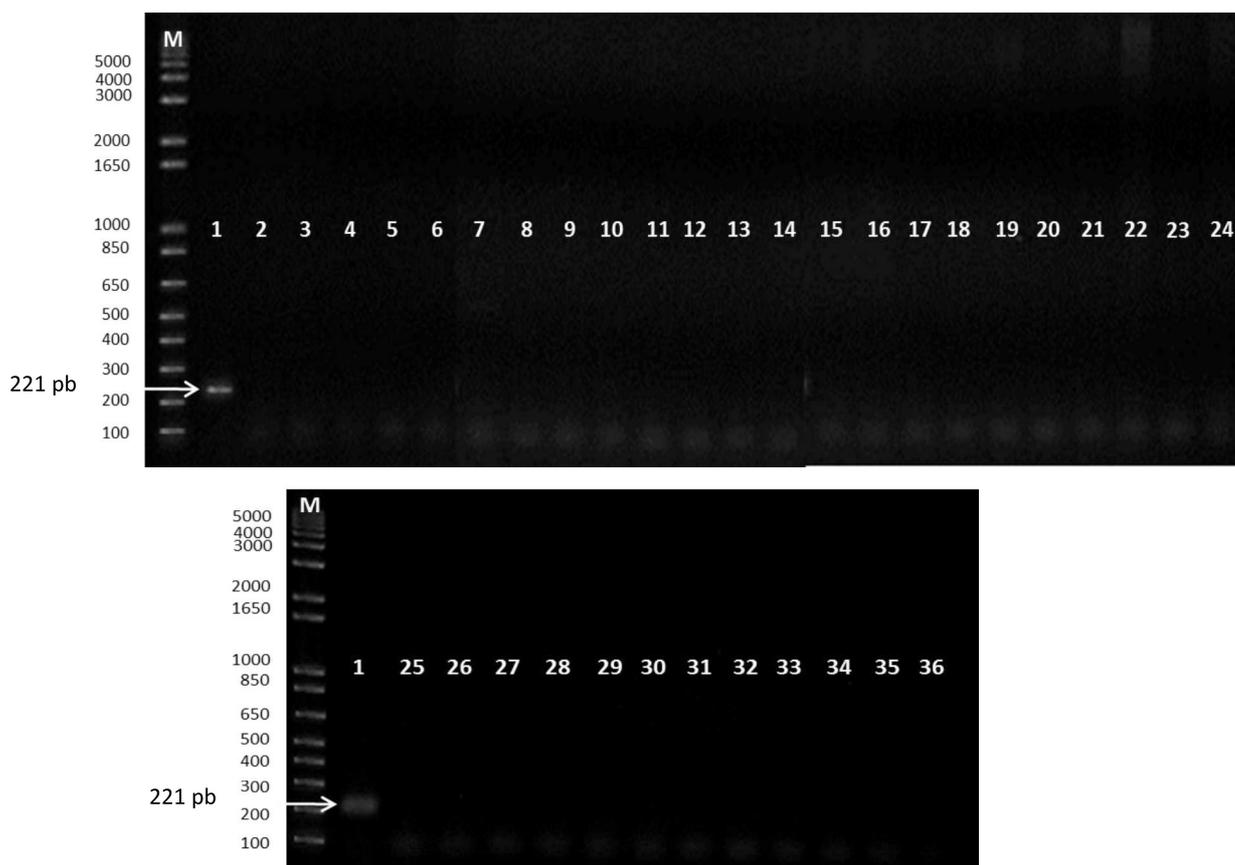


Figura 5.18. Detección de la especificidad de los marcadores CBam83F/CBam83R con cepas de referencia de *Bacillus* y otros géneros bacterianos. (1) 83, (2) FZB42, (3) 10A3, (4) 10A1, (5) 10A18, (6) CCGE2031, (7) Bi43, (8) 6051, (9) 11774, (10) 168, (11) 1A145, (12) 1A141, (13) 6633, (14) CCGE2066, (15) CPA, (16) Fac. Quím 1, (17) CIAD 100, (18) Bi28, (19) Ppe8^T, (20) MTI-641, (21) CFN42, (22) CIAT899, (23) CFN299, (24) PRF81, (25) 7A1, (26) Fac. Quím2, (27) 8A1, (28) 14A1, (29) Bi55, (30) 5A1, (31) 5A24, (32) 16A1, (33) 4A1, (34) 13A1, (35) 26A1, (36) JM1-A. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.



Figura 5.19. Detección de la especificidad de los marcadores CBam83F/CBam83R con cepas aisladas de Yucatán. (1) 83, (2) TP1, (3) TP2, (4) TP4, (5) TP5, (6) TP6, (7) TP9, (8) TP10, (9) TP11, (10) TP13, (11) TP14, (12) S17, (13) TP31, (14) TP32, (15) TP34, (16) S15, (17) S19, (18) S30, (19) S36, (20) Teya 21, (21) Teya 22, (22) Teya 23, (23) Yax 24. (C) Control (-) sin DNA. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

Con respecto al control que se realizó para confirmar la especificidad de los marcadores **CBam83F/CBam83R** en *Bacillus* sp. 83, todas las cepas evaluadas presentaron el fragmento de 1500 pb característico de la secuencia del gen ribosomal (**Figuras 5.20 y 5.21**). Estos resultados confirmaron la especificidad de los marcadores diseñados para la cepa 83, descartando que la ausencia de señal en las cepas evaluadas y mostradas en las **figuras 5.18 y 5.19** no se debió a la falta de DNA a pesar de haberse utilizado 30 ng de cada una, sino que los marcadores no encontraron en los DNAs la secuencia que les permitiera hibridarse para amplificar la banda de 221 pb.

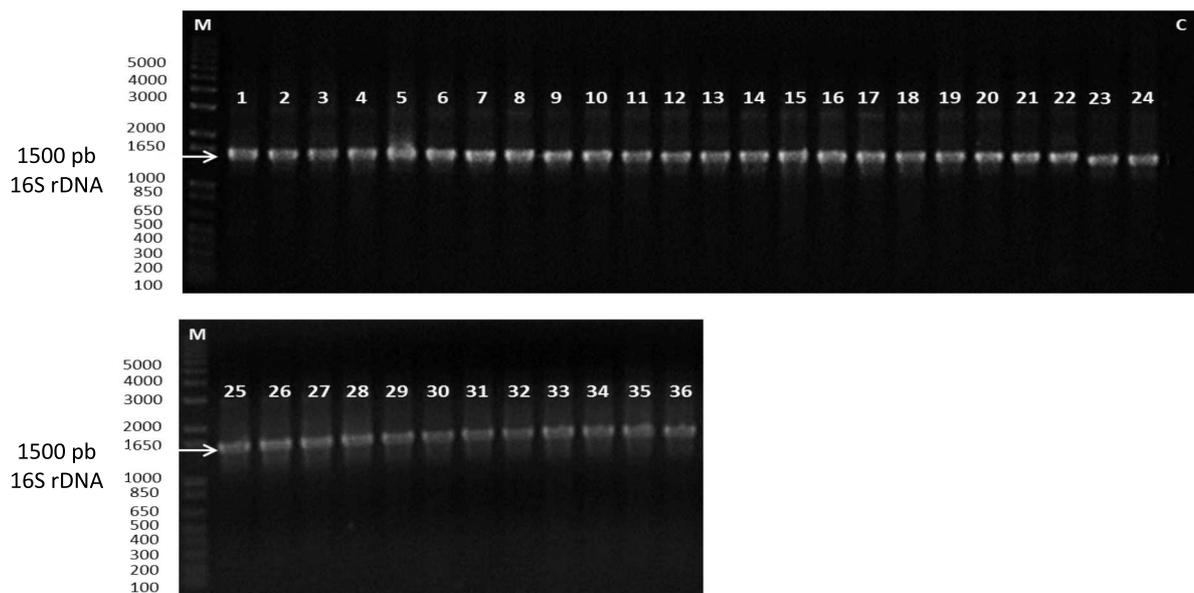


Figura 5.20. Productos de amplificación del gen 16S rDNA de las cepas de referencia. (1) 83, (2) FZB42^T, (3) 10A3, (4) 10A1, (5) 10A18, (6) CCGE2031, (7) Bi43, (8) 6051, (9) 11774, (10) 168^T, (11) 1A145, (12) 1A141, (13) 6633, (14) CCGE2066, (15) CPA, (16) Fac. Quím 1, (17) CIAD 100, (18) Bi28, (19) Ppe8^T, (20) MTI-641, (21) CFN42, (22) CIAT899, (23) CFN299, (24) PRF81, (25) 7A1, (26) Fac. Quím2, (27) 8A1, (28) 14A1, (29) Bi55, (30) 5A1, (31) 5A24, (32) 16A1, (33) 4A1, (34) 13A1, (35) 26A1, (36) JM1-A. (C) Control (-) sin DNA. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

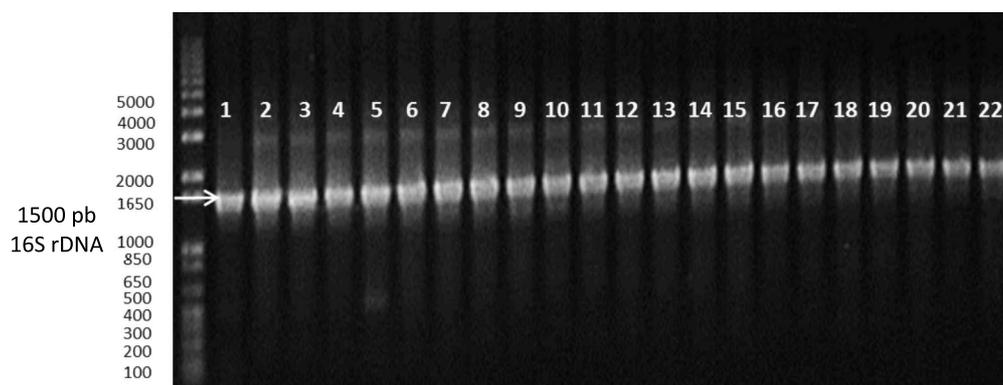


Figura 5.21. Productos de amplificación del gen 16S rDNA de las cepas aisladas de Yucatán. (1) TP1, (2) TP2, (3) TP4, (4) TP5, (5) TP6, (6) TP9, (7) TP10, (8) TP11, (9) TP13, (10) TP14, (11) S17, (12) TP31, (13) TP32, (14) TP34, (15) S15, (16) S19, (17) S30, (18) S36, (19) Teya 21, (20) Teya 22, (21) Teya 23, (22) Yax 24. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

5.5.4. Límite de detección de los marcadores

El límite de detección de los marcadores **CBam83F/CBam83R** fue evaluado a través de PCR cualitativo. Los ensayos donde se utilizaron diluciones de DNA tanto de un cultivo celular puro de la cepa 83 como de células procedentes del formulado *Fungifree AB*[®], mostraron que la concentración de DNA más baja detectada por los marcadores fue de 3×10^{-3} ng por μL^{-1} ($3 \text{ pg por } \mu\text{L}^{-1}$) (correspondiente a la banda más clara) (**Figura 5.22a y b**). Tomando en cuenta que el genoma completo de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T tiene una longitud de 3.9 millones de pb (Chen *et al.*, 2007), se puede inferir que una célula de *B. amyloliquefaciens* contiene aproximadamente 4×10^{-3} pg de DNA total.

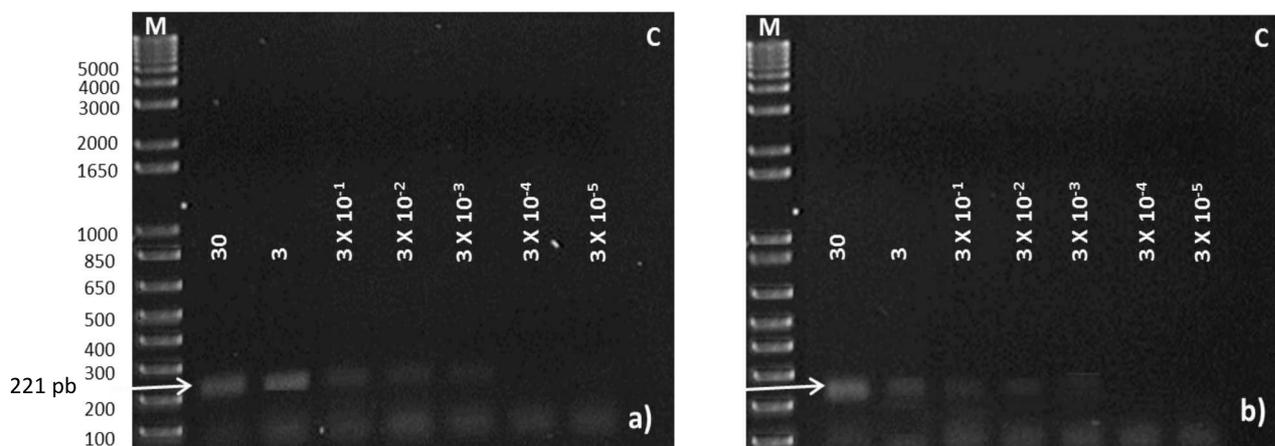


Figura 5.22. Límite de detección de los marcadores CBam83F/CBam83R con DNA de *Bacillus* sp. 83 procedente de a) células de un cultivo puro y de b) células presentes en *Fungifree AB*[®]. Las concentraciones finales fueron: (30), (3), (3^{-1}), (3^{-2}), (3^{-3}), (3^{-4}) y (3^{-5}) ng μL^{-1} . (C) Control negativo (sin DNA). (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

Lo anterior demostró que los marcadores **CBam83F/CBam83R**, fueron capaces de detectar concentraciones más bajas comparados con los diseñados (SCAR TSS₁) por Chen *et al.*, (2010) para la cepa antagonista *B. cereus* TS02, que detectaron $78.13 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA puro de la cepa como la concentración mínima. De acuerdo a una curva de calibración que relacionó la concentración de DNA extraído y la densidad celular usada para tal fin, mostró que la concentración mínima detectada por los marcadores TSS₁ correspondió a 8×10^5 UFC mL^{-1} de la cepa TS02.

Por el contrario, si comparamos la concentración de los marcadores **CBam83F/CBam83R** específicos para la cepa 83 con la mínima concentración que detectaron los marcadores 123F/123R (1-10 pg de DNA por μL) reportados por Felici *et al.*, (2008) para monitorear a la cepa de control biológico *B. subtilis* 101, considerando que ambas cepas pertenecen al mismo grupo taxonómico, se puede observar que la sensibilidad de su marcador es similar a la que se encontró en este estudio con *Bacillus* sp. 83. Ellos

sugirieron que la concentración de DNA genómico detectada por los marcadores 123F/123R, corresponde a 10^3 y 10^4 células de *B. subtilis* 101 que fueron utilizadas para extraer el DNA. Esto da una idea acerca del número de células que pueden ser detectadas por los marcadores **CBam83F/CBam83R** para *Bacillus* sp. 83; sin embargo, se tendrían que cuantificar y relacionar la cantidad con la concentración de DNA para confirmar el dato.

En el siguiente de los ensayos donde se asperjaron en promedio 3.1×10^7 células vegetativas en un mililitro de suspensión sobre la superficie de hojas de papayo procedentes del campo, fue posible detectar señal de amplificación en el gel de agarosa y por lo tanto, identificar a *Bacillus* sp. 83 desde las primeras 2 h hasta el sexto día después de su aspersión. Los resultados mostrados en la **Figura 5.23**, indican que la secuencia de 221 pb de *Bacillus* sp. 83 fue amplificada específicamente por los marcadores **CBam83F/CBam83R**. Esto demostró que el DNA de los microorganismos endémicos presentes en las hojas, no interfirió con la secuencia de los marcadores para amplificar la banda de 221 pb que fue específica para *Bacillus* sp. 83. Esta banda fue similar en intensidad a la de 30 ng de DNA de un cultivo puro que fue detectada en el primer experimento (**Figura 5.22a**).

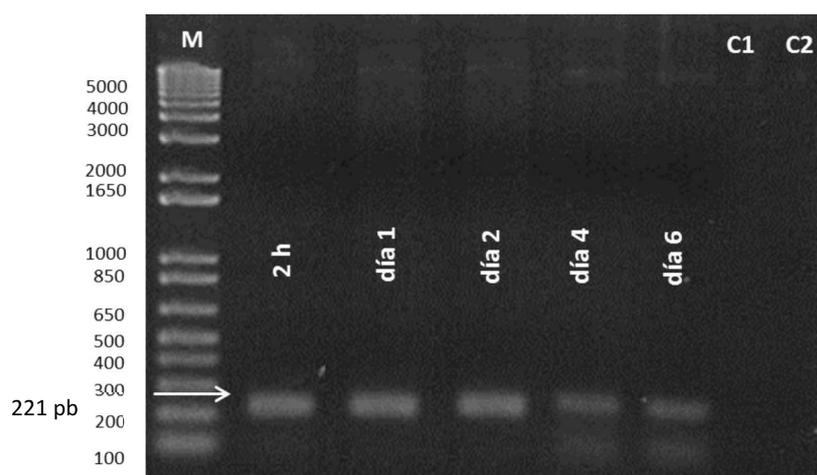


Figura 5.23. Detección con los marcadores CBam83F/CBam83R, de células de *Bacillus* sp. 83 provenientes de un cultivo puro re-aisladas de hojas de papayo. La evaluación se realizó 2 h después de la aspersión, día 1, día 2, día 4 y día 6 después de la aspersión. Se detectó el fragmento específico de 221 pb. (C1) Control negativo (DNA total presente en la hoja sin inocular con *Bacillus* sp. 83). (C2) Control negativo (sin DNA). (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

Finalmente, se demostró la capacidad de detección de los marcadores **CBam83F/CBam83R** mediante PCR cualitativo con DNA extraído de un lavado de hojas de papayo provenientes del campo, que fueron asperjadas con 1×10^7 esporas por gramo de polvo *Fungifree AB*[®] contenido en 1 mL de suspensión.

En la **Figura 5.24** se muestra la señal de amplificación de la banda específica de 221 pb para *Bacillus* sp. 83, visualizada en el gel de agarosa desde 2 h después de haber asperjado el formulado hasta el día 11. La intensidad de la señal de amplificación disminuyó a partir del día 6; sin embargo, los marcadores permitieron detectar la presencia de *Bacillus* sp. 83 hasta el día 11 después de su aspersión.

Algunos autores como Chen *et al.*, (2010) reportaron que la extracción de DNA de las esporas del agente de control biológico *B. cereus* TS02 proveniente del lavado de las hojas inoculadas con la bacteria, no fue exitosa, por lo que tuvieron que agregar un paso de enriquecimiento con medio nutritivo, previo a la extracción con un *kit* comercial. Chen *et al.*, mencionan que trabajar con muestras ambientales como las hojas, donde está presente una población heterogénea de microorganismos incluyendo al agente de control biológico, implica un reto en el protocolo para la extracción y recuperación de suficiente cantidad de DNA útil para la reacción de amplificación con los marcadores específicos diseñados.

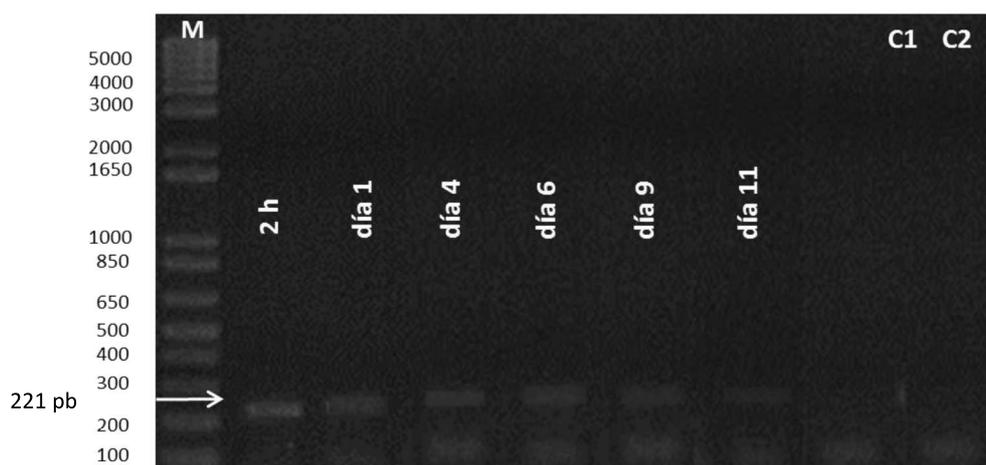


Figura 5.24. Detección con los marcadores CBam83F/CBam83R, de células de *Bacillus* sp. 83 provenientes del formulado *Fungifree AB*[®] re-aisladas de hojas de papayo. La evaluación se realizó (1) 2 h después de la aspersión, (2) día 1, (3) día 4, (4) día 6, (5) día 9, (6) día 11 después de la aspersión. Se detectó el fragmento específico de 221 pb. (C1) Control negativo (DNA total presente en la hoja sin inocular con el formulado de *Bacillus* sp. 83). (C2) Control negativo (sin DNA). (M) Marcador de peso molecular 1 Kb.

Este ensayo de inoculación de hojas de papayo con la cepa 83 presente en el formulado, mostró un primer acercamiento para evaluar los marcadores **CBam83F/CBam83R** para la identificación de *Bacillus* sp. 83 cuando sea aplicado en el campo para el control de enfermedades como antracnosis en cultivos agrícolas como mango y papaya.

6. Conclusiones

En este estudio se desarrolló un marcador molecular que demostró especificidad para identificar al agente de control biológico *Bacillus* sp. 83. Los principales hallazgos de este trabajo fueron:

- Basados en las secuencias amplificadas y caracterizadas de los genes 16S ribosomal y *recA* de *Bacillus* sp. 83, el agente de biocontrol fue identificado molecularmente y agrupado dentro de la especie *B. amyloliquefaciens*.
- Fue posible la detección de los genes *srfAA*, *mInA* y *bmyD* dentro del genoma de *Bacillus* sp. 83 involucrados en la síntesis de los antibióticos tipo lipopéptidos surfactina, macrolactina y bacilomicina D, respectivamente, con oligonucleótidos específicos.
- La secuencia del fragmento de 685 pb de *Bacillus* sp. 83 generado con BOX-PCR mostró alta similitud con la del gen *baeN* involucrado en la síntesis del antibiótico *bacillaene*. Por su parte, la secuencia del fragmento de 1621 pb generado con ERIC-PCR mostró similitud con el gen *mInG*, involucrado en la síntesis del antibiótico macrolactina. Ambos genes han sido encontrados en el genoma de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T.
- Las bandas generadas con OPG-11 RAPD de 1700 pb, ERIC 1R/ERIC 2 de 1700 pb y con BOX-A1R de 250 pb fueron clonadas en el vector pTZ57R/T por estar presentes sólo en *Bacillus* sp. 83.
- La técnica de ERIC-PCR fue la más útil y discriminatoria para la cepa 83, por lo que se diseñaron cuatro marcadores de secuencias caracterizadas provenientes de clonas obtenidas de la ligación de la banda de 1700 pb. Sólo los marcadores **CBam83F/CBam83R** amplificaron un único y reproducible fragmento de 221 pb detectado en *Bacillus* sp. 83, mientras que en las otras especies no fue observable, demostrando de esta forma su alta especificidad hacia el agente de biocontrol.
- El límite de detección mostrado por los marcadores **CBam83F/CBam83R** usando DNA de *Bacillus* sp. 83 fue de 3 pg μL^{-1} .
- Los marcadores **CBam83F/CBam83R** fueron capaces de amplificar la secuencia de 221 pb usando DNA de *Bacillus* sp. 83 presente en hojas de papaya, identificándola después de seis días (células vegetativas) y después de once días (células en el formulado *Fungifree AB*[®]) posterior a su aspersión. Fue posible extraer el DNA de esporas de *Bacillus* sp. 83 provenientes del formulado *Fungifree AB*[®] con el protocolo que se estableció para tal fin.

7. Perspectivas

- Se requieren probar los marcadores **CBam83F/****CBam83R** específicos para *Bacillus* sp. 83 en campo cuando se aplique el formulado *Fungifree AB*[®] en los cultivos agrícolas susceptibles a antracnosis.
- Estudios posteriores podrían enfocarse en el desarrollo de un método de PCR cuantitativo (como PCR en tiempo real), con sondas que emitan fluorescencia y detecten la secuencia discriminadora de *Bacillus* sp. 83 (parte del gen *yomR*) con los marcadores **CBam83F/****CBam83R**.
- El método cuantitativo con el uso de los marcadores **CBam83F/****CBam83R** permitiría el monitoreo de la dinámica de la población del agente de control biológico *Bacillus* sp. 83 aplicado en campo, el cual proporcionaría información sobre el nivel de colonización y tiempo de persistencia en el sitio aplicado.
- Se requiere secuenciar el genoma del agente de control biológico *Bacillus* sp. 83 para conocer sobre genes involucrados en los mecanismos de control frente a fitopatógenos y así también investigar su potencial empleo como promotor de crecimiento en diferentes cultivos.

8. Referencias Bibliográficas

- Adaskaveg, J., Hartin, R. (1997). Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in almond on peach in California. *Phytopathology*, 87(9): 979-987.
- Agrios, G. N. (2000). Control de las enfermedades de las plantas. En: *Fitopatología*. (Ed) Limusa. 2ª Edición. ISBN (9-68185-184-6). México, D.F. pp. 198-200.
- Akem, C. (2006). Mango anthracnose disease: Present status and future research priorities. *Plant Pathology Journal*, 5(3): 266-273.
- Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L. Olmedo, G. (2005). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, 11(332): 10-17.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215 (3): 403-410.
- Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofré, E. (2011). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*. 112(1): 159-174.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8(63): 2-12.
- Arrebola, E., Jacobs, R., Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 386-395.
- Asaka, O., Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4081-4085.
- Athukorala, S.N., Fernando, W.G., Rashid, K.Y. (2009). Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(9): 1021-1032.
- Atkins, S.D., Clark, I.M., Sosnowska, D., Hirsch, P.R., Kerry, B.R. (2003). Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato Cyst nematodes by using conventional PCR, Real Time PCR, selective media, and baiting. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4788-4793.
- Atkins, S. D., Clark, I.M., Pande, S., Hirsch, P.R., Kerry, B.R. (2005). The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 257-264.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134: 307-319.
- Balderas, K. (2004). Control biológico de antracnosis en mango: Aspectos de formulación y de evaluación precisa de la enfermedad. *Tesis de Maestría*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Barkai-Golan, R. (2001). Biological control. In: *Postharvest diseases of fruits and vegetables: Development and control*. Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands, pp. 224-243.
- Beattie, G.A., Lindow, S.E. (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89(5): 353-359.

- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In: *Bacteria in agrobiology: plant growth responses*. Maheswari, D. (ed). Springer, Berlin, pp. 47-52.
- Broggini, G.A.L., Duff, B., Hollige, E., Schärer, H.J., Gessler, C., Patocchi, A. (2005). Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 93-100.
- Buhariwalla, H. K., Srilakshmi, P., Kannan, S., Kanchi, R.S., Chandra, S., Satyaprasad, K., Waliyar, F., Thakur, R.P., Crouch, J.H. (2005). AFLP Analysis of *Trichoderma* spp. from India compared with sequence and morphological-based diagnostics. *Journal of Phytopathology*, 153: 389-400.
- Bulat, S.A., Lübeck, M., Alekhina, I.A., Jensen, D.F., Knudsen, I.M., Lübeck, PS. (2000). Identification of a universally primed PCR derived sequence-characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11): 4758-4763.
- Butcher, R.A., Schroeder, F.C., Fischbach, M.A., Straight, P.D., Kolter, R., Walsh, C.T., Clardy, J. (2007). The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104(5): 1506-1509.
- Carrillo-Fasio, J. A., García, R., Muy-Rangel, M., Sañudo, A., Márquez, I., Allende, R., Galindo, E., Garza, Z., Patiño, M. (2005). Control biológico de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) y su efecto en la calidad postcosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1): 24-32.
- Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W.R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P.R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9): 1007-1014.
- Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., Piel, J., Borriss, R. (2009a). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 140: 27-37.
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., Borriss, R. (2009b). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 140: 38-44.
- Chen, C., Zhang, W., Gao, W., Chen, W., Li, A., Zhang, Y., Liu, H., Zhang, L. (2010) Using a sequence characterized amplified region (SCAR) marker for detection of *Bacillus* strain TS02 sprayed on strawberry plants to biocontrol powdery mildew in fields. *African Journal of Biotechnology*, 9(37): 6049-6055.
- Choudhary, K.D., Johri, B. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164: 493-513.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D., Roberts, D.P. (2008). Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1): 115-123.
- Collins, D.P., Jacobsen, B.J., Maxwell, B. (2003). Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control*, 26: 224-232.
- Cook, R.J. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 53-80.

- Cordier, C., Hermann, V.E., Laurent, F.M., Blal, B., Steinberg, C., Alabouvette, C. (2007). SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 60-68.
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P.L., Sorlini, C. (1998). PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16s and 23s rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 107-116.
- De Clerck, E., De Vos, P. (2004). Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources. *FEMS Microbiology Letters*, 231: 91-98.
- Demoz, B.T., Korsten, L. (2006). *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control*, 37: 68-74.
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R. (2008). Ecology and Genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16(6): 269-275.
- Edel-Hermann, V., Aimé, S., Cordier, C., Olivain, C., Steinberg, C., Alabouvette, S. (2011). Development of a strain specific real-time PCR assay for the detection and quantification of the biological control agent Fo47 in root tissues. *FEMS Microbiology Letters*, 322: 34-40.
- El-Ghaouth, A. (1997). Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 160-162.
- Errington, J. (2003). Regulation on endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1: 117-126.
- Fan, B., Chen, X.H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151: 303-311.
- Felici, C., Vettori, L., Toffanin, A., Nuti, M. (2008). Development of a strain specific genomic marker for monitoring a *Bacillus subtilis* biocontrol strain in the rhizosphere of tomato. *FEMS Microbiology Ecology*, 65: 289-298.
- Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 337-359.
- Galindo, E., Carrillo-Fasio, A., García-Estrada, R., Patiño, M. (2005). Tecnologías para el control de la principal enfermedad del mango (antracnosis) y el efecto en su calidad postcosecha. *Claridades Agropecuarias*, 148: 50-59.
- Gamagae, S.U., Sivakumar, D., Wilson-Wijeratnam, R.S., Wijesundra, R.L.C. (2003). Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. *Crop Protection*, 22(5): 775-779.
- Garrido, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F.J., Boonham, N., Colyer, A., Cantoral, J.A., Budge, G. (2009). Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathology*, 58: 43-51.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2): 221-224.
- Guillén-Cruz, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rodríguez, R., Aguilar, C., Padrón, E., Reyes, M. (2006). *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizotocnia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2): 105-114.

- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3): 307-321.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166: 557-580.
- Harshey, R. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 57: 249-273.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Diaz-Minguez, J.M., Iturriaga, E.A, Monte, E. (2001). Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Current Genetics*, 38: 343-350.
- Heydari, A., Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Science*, 10(4): 273-290.
- Holmberg, A. J., Melin, P., Levenfors, J., Sundh, I. (2009). Development and evaluation of SCAR markers for a *Pseudomonas brassicacearum* strain used in biological control of snow mould. *Biological Control*, 48: 181-187.
- Hsieh, F.C., Lin T.C., Meng, M., Kao, S.S. (2008). Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide Iturin A. *Current Microbiology*, 56: 1-5.
- Huerta-Palacios, G., Holguín-Meléndez, F., Benítez-Camilo, F.A., Toledo-Arreola, J. (2009). Epidemiología de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(2): 93-105.
- Ibarra, J.E., Del-Rincón, Ma. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J.A., Pereyra, B., Alcázar, A., Luna, H., Galán, L., Pardo, L., Muñoz, C., Gómez, I., Soberón, M., Bravo, A. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2): 113-120.
- Jacobsen, B.J., Zidack, N.K., Larson, B.J. (2004). The role of *Bacillus* based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases, *Phytopathology*, 94(11): 1272-1275.
- Jamalizadeh, M., Reza, H., Aminian, H., Alizadeh, A. (2009). Evaluation of *Bacillus* spp. as potential biocontrol agent for postharvest gray mold control on golden delicious apple in Iran. *Journal of Plant Protection Research*, 49(4): 405-410.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 411-441.
- Joshi, R., McSpadden-Gardener, B. (2006). Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Biological Control*, 96(2): 145-154.
- Kim, P., Chung, K. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 234: 177-183.
- Kinkel, L.L. (1997). Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 327-347.
- Kloepper, J., Ryu, C., Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259-1266.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4): 1084-1096.

- Krebs, B., Hoeding, B., Kubart, S.M., Workie, A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H., Hevesi, M. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Disease Protection* 105: 181-197.
- Kunst, F., et al. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390: 249-256.
- Kwon, G.H., Lee, H.A., Park, J.Y., Kim, J.S., Lim, J., Park, C., Kwon, D.Y., Kim, Y.S., Kim, J.K. (2009). Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 282-287.
- Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Raaijmakers, J.M., McSpadden, B.B., Thomashow, L.S., Weller, D.M. (2002). Differential ability of genotypes of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7): 3226-3237.
- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4577-4584.
- Lee, J.P., Lee, S.W., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K.Y., Kim, H.J., Jung, S.J., Moon, B.J. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37: 329-337.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K. (1997). Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Biological Control*, 87(11): 1103-1110.
- Lima, G., Curtis, F., Castoria, R., Cicco, V. (2003). Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 341-349.
- Louws, F., Fulbright, D., Stephens, C., De Bruijn, F. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7): 2286-2295.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant-growth promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541-556.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptack, M. (1992). Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, 74: 1047-1051.
- Marten, P., Smalla, K., Berg, G. (2000). Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 463-471.
- Massart, S., Clercq, D., Salmon, M., Dickburt, C., Jijakli, M.H. (2005). Development of real-time PCR using minor groove binding probe to monitor the biological control agent *Candida oleophila* (strain O). *Journal of Microbiological Methods*, 60: 73-82.
- Mercier, J., Lindow, S.E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1): 369-374.
- Morales, D. (2007). Desarrollo de un proceso de alta densidad celular para la producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83 con alta viabilidad. *Tesis de Maestría*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Ongena, M., Jacques, P., Toure, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 69(1): 29-38.
- Ongena, M., Jacques, P. (2007). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3): 115-125.
- Ongena, M., Henry, G., Thonart, P. (2010). The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. In: *Recent developments in management in plant diseases*. (Ed). New York. Springer, pp. 59-69.
- Paran, I., Michelmore, R.W. (1993). Development and reliable PCR-based markers link to powder downy resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(8): 985-993.
- Paredes, J., Carrillo, J., García, R., Allende, R., Sañudo, J., Valdez, J. (2008). Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1): 27-35.
- Patel, P.S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P., Mayerl, F. (1995). Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 48(9): 997-1003.
- Patiño-Vera, M., Jiménez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., Galindo, E. (2005). Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3): 540-550.
- Phae, C.G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M., Ushiyama, K. (1992). Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 58: 329-339.
- Posada, D., Buckley, T.R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion a bayesian approaches over likelihood ratio tests. *System Biology*, 53: 793-808.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L.A., Berkeley, R.C. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. norn. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1): 69-71.
- Pujol, M., Badosa, E., Cabrefiga, J., Montesinos, E. (2005). Development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biocontrol agent of fire blight. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 343-352.
- Pujol, M., Badosa, E., Manceau, C., Montesinos, E. (2006). Assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and Real-Time PCR methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2421-2427.
- Rademaker, J.W., de Bruijn, F.J. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: *DNA Markers: protocols, applications and overviews*. Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. (Ed). New York, U.S.A, John Wiley and Sons, pp. 151-177.
- Reva, O.N., Dixelius, C., Meijer, J., Priest, F.G. (2004). Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 249-259.
- Rodríguez, L. (2005). Producción y formulación de *Bacillus subtilis* CPA como agente de control biológico. *Tesis de Maestría*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rubio, M.B., Hermosa, M.R., Keck, E., Monte, E. (2005). Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology*, 49(1): 25-33.

- Rückert, C., Bloma, J., Chen, X.H., Reva, O., Borriss, R. (2011). Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7^T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Biotechnology*, 155: 78-85.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Paré, P.W., Kloepper, J.W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3): 1017-1026.
- Serrano-Carreón, L., Galindo-Fentanes, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*, 58(1): 77-88.
- Serrano-Carreón, L., Balderas-Ruiz, K., Wong-Urrea, M.A., Rosas-Velázquez, D.R., Galindo-Fentanes, E. (2010). Biofungicidas para el control biológico de la antracnosis del mango: logrando frutos de alta calidad internacional para mercados exigentes *Claridades Agropecuarias*, 208: 28-37.
- Schena, L., Sialer, M.F., Gallitelli, D. (2002). Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease*, 86(1): 54-60.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W., Jackson, M.A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. In: *Symposium The Nature and application of biocontrol microbes: Bacillus* spp., 94(11): 1267-1271.
- Schloss, P.D., Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1501-1506.
- Schneider, K., Chen, X.H., Vater, J., Franke, P., Nicholson, G., Borriss, R., Süssmuth, R.D. (2007). Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Natural Products*, 70(9), 1417-1423.
- Sigler, W.V., Nakatsu, C.H., Reicher, Z.J., Turco, R.F. (2001). Fate of the biological control agent *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 after application to turfgrass. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8): 3542-3548.
- Slepecky, R.A., Hemphill, H.E. (2006). The genus *Bacillus* nonmedical. In: *The Prokaryotes*. 4: 530-562. Third edition, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (eds). Springer, New York, 4(1.2.16): 530-560.
- Solís, Y. (2010). Identificación parcial de antibióticos ciclo-lipopéptidos termorresistentes producidos por *Bacillus subtilis* 83 con actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur, M., Garcia, A.F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6): 1247-1256.
- Spadaro, D., Gullino, M L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 185-194.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis*: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845-857.
- Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Cortes-Velázquez, A., Lappe, P., Larqué-Saavedra, A., Pérez-Brito, D. (2009). PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Molecular Biotechnology*, 40(3): 293-298.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J.F., Plewniak, F.J., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.

- Tombolini, R., Unge, A., Davey, M.E., de Bruijn, F.J., Jansson, J.K. (1997). Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 22: 17-28.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5): 1151-1160.
- Van Elsas, J.D., Duarte, G.F., Rosado, A.S., Smalla, K. (1998). Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 133-154.
- Van Veen, J.A., Van Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2): 121-135.
- Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24): 6823-6831.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531-6535.
- Williamson, S.M., Guzman, M., Marin, D.H., Anas, O., Jin, X., Sutton, T.B. (2008). Evaluation of *Pseudomonas syringae* strain ESS-11 for biocontrol of crown rot and anthracnose of bananas. *Biological Control*, 46(3): 279-286.
- Wilson, K. (1997). Preparation of genomic DNA from bacteria. In: *Current protocols in molecular biology*. Ausubel, F. (ed). John Wiley and Sons, Inc. New York, U.S.A, pp. 2.4.1-2.4.5.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., Shirat, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Biological Control*, 91(2): 181-187.
- Zhang, H., Wang, L., Ma, L., Dong, Y., Jiang, S., Xu, B., Zheng, X. (2009). Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameter. *Biological Control*, 48(1): 79-83.

9. Anexos

Anexo 9.1. Preparación de soluciones

- **Buffer TAE stock 50X (1 L de solución)**

- 242 g Trizma-base
- 57.1 mL Ácido acético glacial
- 37.2 g Na₂EDTA·2H₂O

- **Solución CTAB/NaCl (100 mL de solución)**

- 4.1 g NaCl
- 10 g CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio)

Mezclar y si es necesario calentar a 65 °C hasta su total disolución. Conservar a temperatura ambiente.

- **RNasa**

- A 987 µL de agua ultrapura se le agregan:
- RNasa 0.01 g
- Solución de Tris-Cl 1M pH 7.4, 10 µL
- Solución NaCl 5M, 3 µL

Lo anterior se mezcla hasta su total disolución y se calienta durante 15 min a 100 °C. Se deja enfriar y se hacen alícuotas de 25 µL y se almacenan a -20 °C. Estas alícuotas se utilizan resuspendidas en 500 µL de *buffer* TE.

- **Solución TfbI**

- 30 mM Ácido cítrico. Ajustar el pH a 5.8 con 0.2 M de ácido acético
- 100 mM RbCl₂
- 10 mM CaCl₂ 2H₂O
- 50 mM MgCl₂ 4H₂O
- 15 % (v/v) Glicerol ultrapuro

Ajustar el pH final a 5.8 con Ácido acético glacial concentrado y el volumen final de la solución. Esterilizar por filtración.

- **Solución TfbII**

- 10 mM MOPS. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH
- 75 mM CaCl₂ 2H₂O
- 10 mM RbCl₂
- 15 % (v/v) Glicerol ultrapuro

Ajustar el pH final a 7.0 con Hidróxido de sodio concentrado y el volumen final de la solución. Esterilizar por filtración.

Anexo 9.2. Prueba de antagonismo de *Bacillus sp. 83*

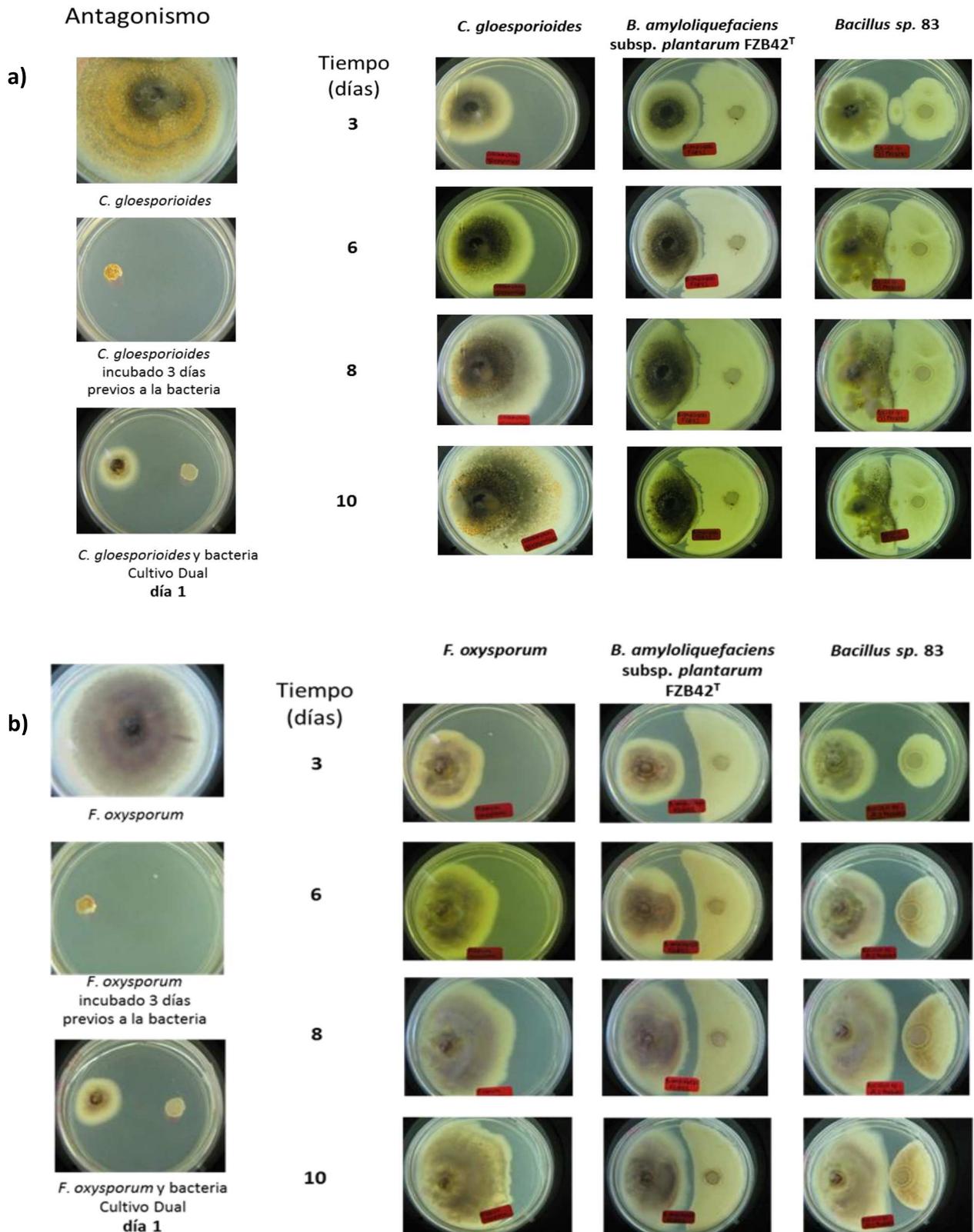


Figura 9.2.1. Monitoreo del antagonismo de *Bacillus sp. 83* contra a) *C. gloesporioides* y b) *F. oxysporum*.

Anexo 9.3. Mapa del vector pTZ57R/T

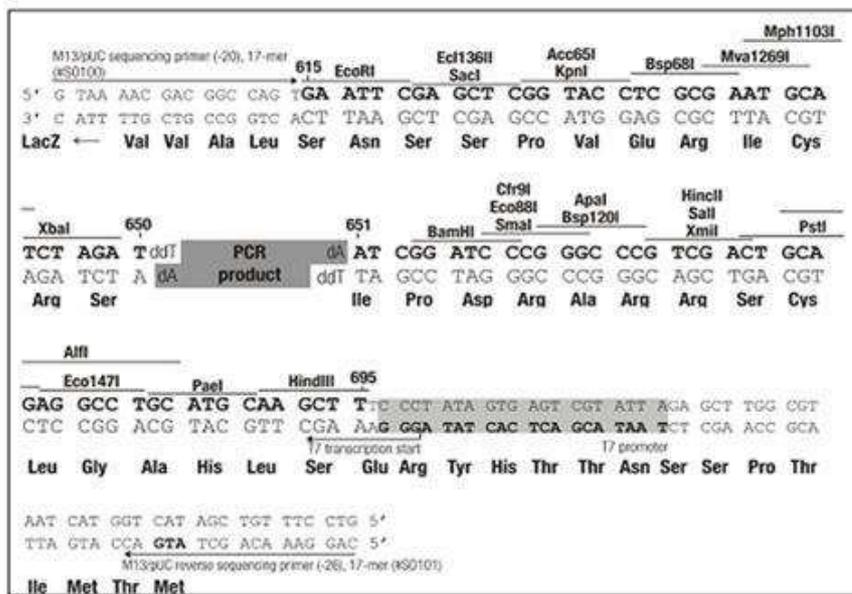
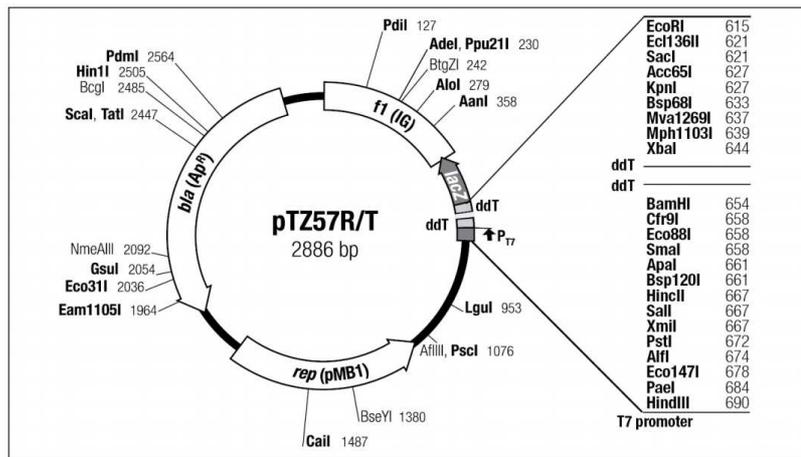


Figura 9.3.1. Mapa del vector de clonación pTZ57R/T para los fragmentos correspondientes al genoma de *Bacillus* sp. 83.

Tabla 9.3.1. Oligonucleótidos utilizados en base al vector para el análisis de transformantes y secuenciación de fragmentos de *Bacillus* sp. 83.

Nombre	Secuencia (5'->3')	Aplicación
M13 Forward (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G	Análisis de transformantes gen 16S rDNA y de fragmentos RAPD,BOX y ERIC
M13 Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Análisis de transformantes gen 16S rDNA
T7 Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	Análisis de transformantes de fragmentos RAPD,BOX y ERIC

Anexo 9.4. Análisis de transformantes y purificación de plásmidos usados en el estudio

9.4.1. Análisis de colonias transformantes

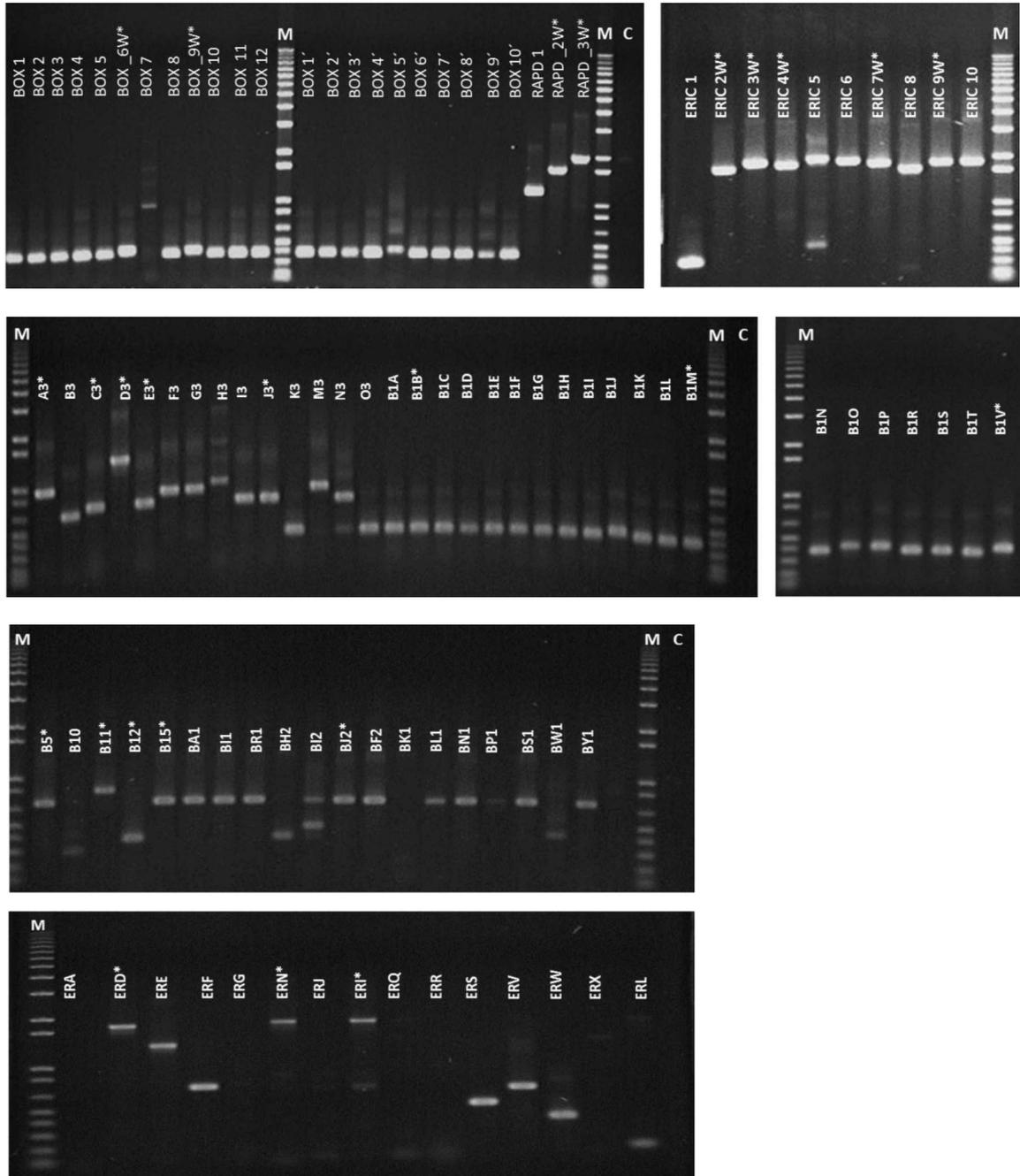


Figura 9.4.1. Análisis de transformantes con el inserto de la banda amplificada con BOX-A1R, RAPD OPG-11 y ERIC 1R/ERIC 2. Las clonas señaladas con asterisco (*) fueron secuenciadas. (M) Marcador de peso molecular 1Kb. (C) control negativo (sin DNA).

9.4.2. Plásmidos purificados

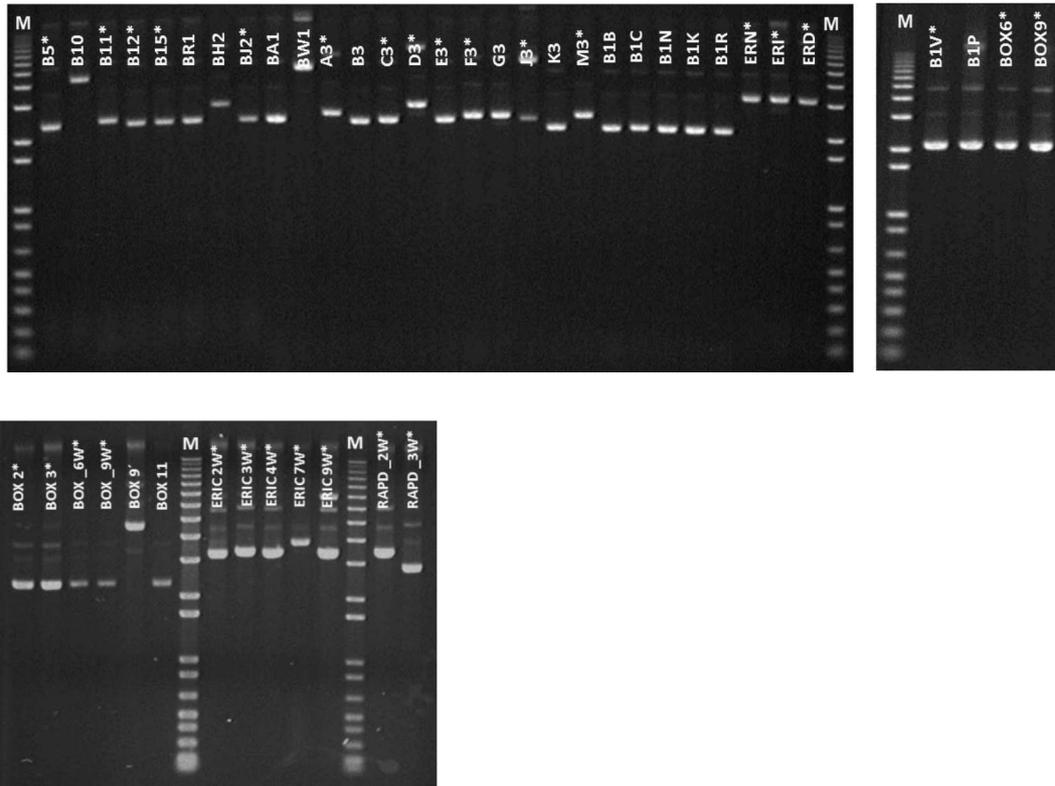


Figura 9.4.2. Purificación de plásmidos con el inserto de la banda amplificada con BOX-A1R, RAPD OPG-11 y ERIC 1R/ERIC 2. Los plásmidos señalados con asterisco (*) fueron secuenciados. (M) Marcador de peso molecular 1Kb.

Anexo 9.5. Perfiles genómicos de cepas similares a *Bacillus sp. 83*

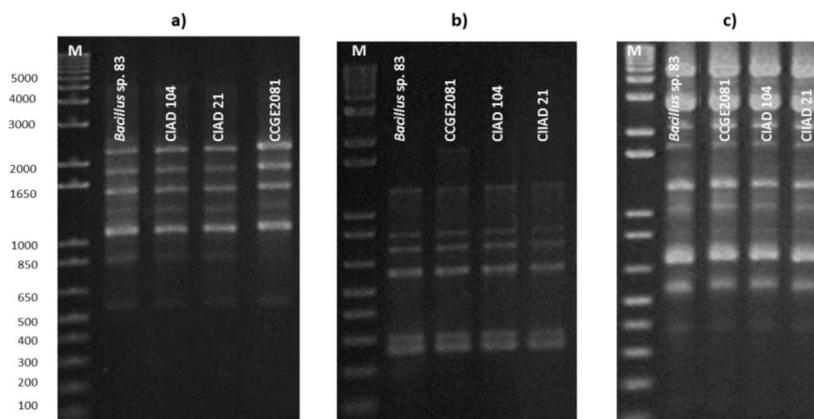


Figura 9.5.1. Cepas de *Bacillus* que presentaron perfiles genómicos de a) RAPD, b) BOX y c) ERIC semejantes al agente de biocontrol *Bacillus sp. 83*.

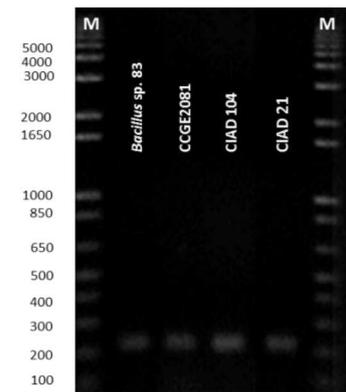


Figura 9.5.2. Cepas de *Bacillus* que presentaron la banda de 221 pb amplificada con los marcadores CBam83F/CBam83R.