



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO SALAMANCA

**“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y
thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS

Presenta

IBT. America Selene Gaona Mendoza

Directora de Tesis:

Dra. Luz Edith Casados Vázquez

Co-Director de Tesis:

Dr. Julio Armando Massange Sánchez

Universidad de Guanajuato
Irapuato, Gto.
Julio 2021
México

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



"2021. AÑO DE LA INDEPENDENCIA".

"En la Universidad de Guanajuato todas y todos, nos comprometemos a garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

**"Sincronización de la producción de proteínas Cry1A,
ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*"**

TESIS

QUE PRESENTA

AMERICA SELENE GAONA MENDOZA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOCENCIAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

Irapuato, Gto., Julio de 2021.

**CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA**

Ex Hacienda El Copal, Km 9 Carretera Irapuato-Silao:
C.P.36824 A.P. 311, Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 462 624 18 89.

www.irapuatosalamanca.ugto.mx



"2021. AÑO DE LA INDEPENDENCIA".
"En la Universidad de Guanajuato todas y todos, nos comprometemos a
garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0192/2021.

Asunto: TEMA DE TRABAJO.

C.

DR. ROGELIO COSTILLA SALAZAR,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación de la C. America Selene Gaona
Mendoza, me permito comunicar a Usted que el tema señalado fue:

**"Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y
Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*"**

Y que dicho trabajo ha sido totalmente elaborado y cuenta con mi
aprobación.

Asimismo, me permito proponer a:

**DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA
DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO**

Para que junto conmigo integren el Jurado.

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 2 de Julio de 2021.
DIRECTOR DE TESIS

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

**CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA**

Ex Hacienda El Copal, Km 9 Carretera Irapuato-Sllao:
C.P.36824 A.P. 311, Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 462 624 18 89.

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



"2021. AÑO DE LA INDEPENDENCIA".
"En la Universidad de Guanajuato todas y todos, nos comprometemos a
garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0193/2021.

Asunto: REVISIÓN DE TESIS.

Irapuato, Gto., 6 de Julio 2021.

C.

DR. ROGELIO COSTILLA SALAZAR
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

Habiendo revisado la Tesis de la Pasante C. America Selene Gaona
Mendoza,

Titulada:

**"Sincronización de la producción de proteínas
Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus
thuringiensis*"**

Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma.

DIRECTOR

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

SINODAL

DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

SINODAL

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

**CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA**

Ex Hacienda El Copal, Km 9 Carretera Irapuato-Silao:
C.P.36824 A.P. 311, Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 462 624 18 89.

www.irapuatosalamanca.ugto.mx



"2021. AÑO DE LA INDEPENDENCIA".

"En la Universidad de Guanajuato todas y todos, nos comprometemos a garantizar el derecho de las mujeres a vivir libres de violencia"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

C.

DR. ROGELIO COSTILLA SALAZAR,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación de la C. America Selene Gaona nos permitimos comunicar a Usted que el trabajo de Tesis: "Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*", que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Luz Edith Casados Vázquez profesora de la División de Ciencias de la Vida, y como Codirector el Dr. Julio Armando Massange Sánchez, ha sido terminado. El escrito fue revisado por el Dr. José Eleazar Barboza Corona, y la Dra. María Cristina del Rincón Castro y se autorizó la impresión y empastado del mismo.

Así mismo, nos permitimos proponer para la integración del Jurado a los Señores;

DR.	JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA	PRESIDENTE
DRA.	MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO	SECRETARIO
DRA.	LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ	VOCAL

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 7 de Julio de 2021.

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ
DIRECTOR

REVISOR

DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

REVISOR

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO.

CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

Ex Hacienda El Copal, Km 9 Carretera Irapuato-Silao:
C.P.36824 A.P. 311, Irapuato, Gto., México.
Tel. y Fax: 462 624 18 89.

Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología y Microbiología Molecular de la Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Guanajuato. Con el apoyo económico de CONACyT con el programa de Becas Nacional (Tradicional) 2019-2.

Bajo la dirección de la Dra. Luz Edith Casados Vázquez y la codirección del Dr. Julio Armando Massange Sánchez; como parte del comité evaluador: el Dr. José Eleazar Barboza Corona y la Dra. María Cristina del Rincón Castro.

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) es el Agente de Control Biológico con mayor éxito en el mercado de los bioplaguicidas debido a la producción de proteínas insecticidas Cry contra insectos plaga como *Spodoptera frugiperda* que afecta severamente la calidad y rendimiento del cultivo de maíz. Aunada a la producción de proteínas insecticidas, Bt tiene la capacidad de sintetizar otros compuestos de valor biotecnológico como quitinasas y bacteriocinas que pueden actuar en conjunto para: 1) incrementar la actividad insecticida (quitinasa-proteína Cry) y 2) promover el crecimiento (bacteriocinas) de cultivos meramente importantes para el sector agrícola. Por tal motivo, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la cepa de *Bacillus thuringiensis* recombinante productora de las proteínas Cry1Ac, ChiA74 y thurincina H en la etapa de esporulación como bioestimulante vegetal y agente de control biológico. A partir de la transformante de Bt subespecie *kurstaki* HD1 pSTAB/ChiA74 Δ sp-pSTAB/pThur; se determinó el tiempo de sincronización para la producción de thurincina H, quitinasa (ChiA74 Δ sp) y el cristal insecticida (Cry1Ac), es decir las 72 h de crecimiento. Además, se comprobó que el uso de thurincina H pura (5×10^{-9} M) y en extracto crudo (80 μ g/mL) tiene un efecto promotor de crecimiento durante la etapa de germinación de maíz. Por lo cual, muestra una opción viable para obtener los tres productos a partir de una sola cepa productora para futuras aplicaciones en maíz y evaluar su efecto en el control de *S. frugiperda*, así como su efecto promotor de crecimiento.

Palabras clave: Bacteriocina, Bioestimulante, proteína insecticida, quitinasa.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is the most successful Biological Control Agent in the biopesticide market due to the production of Cry insecticidal proteins against pest insects such as *Spodoptera frugiperda* that severely affects the quality and yield of the corn crop. In addition to the production of insecticidal proteins, Bt has the ability to synthesize other compounds of biotechnological value such as chitinases and bacteriocins that can act together to: 1) increase insecticidal activity (chitinase-Cry protein) and 2) promote growth (bacteriocins) of crops that are merely important for the agricultural sector. For this reason, the present work aims to evaluate the recombinant *Bacillus thuringiensis* strain that produces the Cry1Ac, ChiA74 and thurincin H proteins in the sporulation stage as a plant biostimulant and biological control agent. From the transformant of Bt subspecies *kurstaki* HD1 pSTAB / ChiA74Δsp-pSTAB / pThur; The synchronization time was determined for the production of thurincin H, chitinase (ChiA74Δsp) and the insecticidal crystal (Cry1Ac), that is, 72 h of growth. In addition, it was found that the use of pure thurincin H (5x10.9M) and in crude extract (80 µg / mL) has a growth promoting effect during the corn germination stage. Therefore, it shows a viable option to obtain the three products from a single producer strain for future applications in corn and to evaluate its effect on the control of *S. frugiperda* as well as its growth-promoting effect.

Keywords: Bacteriocin, Plant Biostimulant, insecticidal protein, chitinase.

El presente trabajo está dedicado a mi familia por ser mi apoyo a lo largo toda mi trayectoria en el ámbito escolar y a lo largo de mi vida. A todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

De manera general, agradezco a todas las personas que contribuyeron en mi desarrollo integral así mismo, el permitir realizarme plenamente en el ámbito profesional.

Agradezco al CONACyT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Quiero agradecer a mi directora de tesis, Dra. Luz Edith Casados Vázquez, por la dedicación y apoyo brindado a este trabajo. De igual manera, agradezco a mi codirector, Dr. Julio Armando Massange Sánchez por todos sus conocimientos invaluableles que me brindó, así como a los doctores que formaron parte de mi comité: Dr. José Eleazar Barboza Corona y Dra. María Cristina del Rincón Castro.

Gracias a mi familia: a mi madre Edilma Mendoza que siempre mostro interés por mi educación y desarrollo profesional, a mi padre Juan Gaona y de igual manera a mi hermana Kennya y hermanos Alejandro, Adán y Juan. A todos mis amigos que me ayudaron de manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda.

A la Universidad de Guanajuato por ser la sede de todo el conocimiento adquirido estos años. En especial al Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Molecular, así como al Laboratorio Nacional PlanTECC, por proporcionar recursos materiales para mi formación en este posgrado.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	15
II. REVISIÓN DE LITERATURA	17
II.I. El maíz, un cultivo de gran importancia en México	17
II.I.I. Etapas fenológicas.....	17
II.I.II. Exigencias edafoclimáticas y nutricionales.....	19
II.I.III. Importancia económica.....	20
II.II. <i>Spodoptera frugiperda</i> , una plaga de alto impacto	22
II.II.I. Ciclo biológico.....	22
II.II.II. Modo de ataque al cultivo.....	24
II.II.III. Estrategias para el control de <i>S. frugiperda</i> y mejora del rendimiento del maíz.....	25
II.III. <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
II.III.I. Biología.....	26
II.III.II. Toxinas Cry de <i>Bt</i>	27
II.III.III. <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD1.....	29
II.III.IV. Mecanismo de acción de proteínas Cry.....	30
II.IV. Quitinasas	31
II.IV.I. Quitinasa ChiA74.....	32
II.V. Bacteriocinas.....	33
II.V.I. Thurincina H.....	34
II.V.II. Clúster genético de la thurincina H.....	34
II.V.III. Bacteriocinas de <i>Bt</i> con propiedades promotoras de crecimiento vegetal.....	36
III. JUSTIFICACIÓN	38
IV. HIPÓTESIS.....	39
V. OBJETIVO GENERAL	39
V.I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40

VI.I. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	40
VI.II. Evaluación de la producción del complejo espora-cristal, quitinasa y bacteriocina.....	40
VI.II.I. Actividad antibacteriana de thurincina H.....	41
VI.II.II. Monitoreo de la formación de cristales insecticidas.....	42
VI.II.III. Recuento de esporas.....	42
VI.II.IV. Determinación de la actividad quitinolítica.....	43
VI.III. Determinación de la actividad promotora de crecimiento de thurincina H en la etapa de germinación del maíz (<i>Zea mays</i>)	43
VI.III.I. Purificación parcial de Thurincina H.....	43
VI.III.II. Purificación de thurincina H por FPLC.....	44
VI.III.III. Cuantificación de thurincina pura.....	45
VI.III.IV. Obtención de extractos crudos de Cry ^B silvestre Cry ^B /pThur, Cry ^B /pThur-ThnA.....	45
VI.III.V. Cuantificación por el método de Lowry modificado.....	46
VI.III.VI. Establecimiento de las condiciones óptimas para la aplicación de extractos crudos en maíz.....	47
VI.III.VII. Ensayo de actividad promotora de crecimiento bajo condiciones de estrés salino.....	49
VI.III.VIII. Comparación del efecto promotor de crecimiento entre thurincina H purificada y extracto crudo.....	50
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
VII.I. Determinación del tiempo de producción de quitinasa, bacteriocina y proteína Cry1A en la cepa recombinante de Bt HD1 pSTAB-ChiA74dsp/ThurH.	52
VII.I.I. Cinética de crecimiento.....	52
VII.I.II. Determinación del tiempo de sincronización en la producción del complejo espora-cristal, quitinasa y bacteriocina.....	53
VII.II. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de thurincina H en maíz	61

VII.II.I. Purificación de thurincina H.....	61
VII.II.II. Producción de extractos crudos.....	62
VII.II.III. Evaluación de la actividad de thurincina H en extracto crudo sobre la germinación de maíz sometidas a estrés salino (NaCl).....	63
VII.II.IV. Efecto promotor de crecimiento de thurincina H pura y en extracto crudo.....	72
VIII. CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i>	24
2. Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
3. Estructura tridimensional de la toxina Cry1A.....	28
4. Mecanismo de acción de proteínas Cry.	30
5. Clúster de la Thurincina H.....	35
6. Estructura química de la thurincina H.....	35
7. Cinética de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	52
8. Actividad antibacteriana	54
9. Actividad enzimática.....	55
10. Microscopía por Contraste de Fases.....	57
11. Monitoreo de la producción de proteínas Cry 1A	58
12. Monitoreo de esporas viables.....	60
13. Purificación de thurincina H.....	61
14. Síntesis y ausencia de thurincina H en extractos crudos	62
15. Longitud radicular en semillas tratadas con thurincina H 50 mM	66
16. Longitud radicular en semillas tratadas con thurincina H 100 mM	67
17. Longitud radicular en semillas tratadas con thurincina H 200 mM.	68
18. Actividad antibacteriana contra <i>Bacillus cereus</i> 183.	69
19. Efecto del tratamiento 3 en maíz bajo estrés salino 50 mM.	70

20. Efecto del tratamiento 3 en maíz bajo estrés salino 100 mM.	71
21. Efecto del tratamiento 3 en maíz bajo estrés salino 200 mM	71
22. Comparación del efecto de thurincina H en diferentes grados de pureza durante la etapa de germinación de maíz blanco.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Etapas de crecimiento del maíz.	18
2. Cepas utilizadas para la evaluación de la sincronización de las proteínas. ...	40
3. Establecimiento de concentraciones de thurincina H.	47
4. Aplicación de thurincina H en maíz.	50
5. Recuento medio de esporas viables	59
6. Evaluación de la germinación de maíz blanco en estrés salino 50 mM.	66
7. Evaluación de la germinación de maíz blanco en estrés salino 100 mM.	67
8. Evaluación de la germinación de maíz blanco en estrés salino 200 mM.	68
9. Aplicación del tratamiento 4 en maíz blanco durante la etapa de germinación.	70
10. Porcentaje de germinación de maíz blanco (B-937 BIOSEMILLAS).	73

I. INTRODUCCIÓN

En México, la producción anual de maíz representa más del 30% de la producción agrícola nacional y el 6.6% del terreno cultivable del país. Sin embargo, el rendimiento promedio de 3.71 toneladas por hectárea (Juarez & Harrison, 2019) del país, es 37% inferior al promedio mundial de 5.9 toneladas por hectárea (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura [FIRA], 2019). El rendimiento del cultivo se ve afectado por factores abióticos y bióticos; siendo un ejemplo claro de estos últimos los insectos plaga que ocasionan daño económico y productivo (Blanco *et al.*, 2014). *Spodoptera frugiperda* es uno de los principales insectos que dañan el tejido foliar y afectan el cogollo del maíz.

S. frugiperda se manifiesta desde la etapa de plántula hasta el periodo de madurez, lo que origina pérdidas que van del 30 hasta el 60% de la producción en México (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA], 2014). Esta plaga ha sido controlada primordialmente por plaguicidas de origen químico a nivel mundial (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018), sin embargo, su control demanda de 3 a 4 aplicaciones químicas hasta su erradicación, siendo una actividad asociada con la contaminación del medio ambiente y que además ha contribuido al desarrollo de resistencia de insectos-plaga y a la destrucción de enemigos naturales (Guédez *et al.*, 2008). Como estrategia para combatir plagas en los cultivos agrícolas y sin impactar de manera negativa en los suelos, ecosistemas y la salud humana, se ha optado por implementar el uso de agentes de control biológico (ACB) como una alternativa sustentable; en este contexto, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es el ACB con mayor éxito en el mercado de los bioplaguicidas debido a la producción de proteínas insecticidas Cry y Cyt (Schnepf *et al.*, 1998), las cuales presentan actividad contra una gran diversidad de insectos. *Bt* es más conocido por estas proteínas, también tiene la capacidad de sintetizar otras proteínas de valor biotecnológico como quitinasas, proteínas insecticidas vegetativas (Vip), péptidos antimicrobianos y parasporinas que puede usarse para sinergizar la actividad de las proteínas Cry, controlar las plagas de lepidópteros y

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

coleópteros, inhibir las bacterias patógenas transmitidas por los alimentos y matar las células cancerosas humanas de diversos orígenes, respectivamente (Nagpure *et al.*, 2014; Lacey *et al.*, 2015; Palma *et al.*, 2014).

Recientemente, el interés por cepas del género *Bacillus* se basa en metabolitos que presentan actividad promotora del crecimiento de las plantas, dentro de los cuales se encuentran las bacteriocinas de *Bt* cuyo estudio refleja la colaboración de las mismas en el aumento de la tasa fotosintética en plantas como maíz y el incremento en la tasa de nodulación al actuar en sinergia con bacterias de la rizosfera en el caso de soja (Lee *et al.*, 2009). Aunque cada producto es sintetizado en diferentes fases de crecimiento de *B. thuringiensis*, las cualidades que derivan de cada uno han convertido a *Bt* en objeto de estudio para su mayor aprovechamiento de manera individual o en sinergia aumentando el valor de esta bacteria por la gran diversidad de usos y nuevas oportunidades de aprovechamiento. Por tal motivo, el presente trabajo tiene como objetivo generar un producto integrado por cristales Cry1Ac, quitinasa ChiA74dsp y thurincina H sintetizados en fase de esporulación, para su uso como agente insecticida contra *S. frugiperda* y promotor de crecimiento en maíz.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.I. El maíz, un cultivo de gran importancia en México

El maíz (*Zea mays*) es una planta anual monoica robusta que pertenece a la familia de las gramíneas cuyo origen se cree que fue en los trópicos de América Latina (centro-sur de México). (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), 2003). En conjunto con el trigo y el arroz, el maíz es uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y animales (Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios, 2018). La composición química del maíz, en promedio es de 70 %- 75 % de almidón, 8 % -10 % de proteína, 4 % - 5 % de lípidos, 1 % - 3 % de azúcares y 1 %- 4 % de cenizas (Earle, 1977; Hallauer, 2000; Arendt & Emanuele, 2013). Los granos inmaduros contienen niveles relativamente altos de azúcares y menores cantidades de almidón, proteína y lípidos, ya que éstos se acumulan durante la maduración (Boyer & Shannon, 1983). El grano de maíz contiene vitaminas A (β -caroteno) y E, tiamina (vitamina B1) y la piridoxina (vitamina B6). Y entre los minerales se pueden encontrar, e fósforo (en forma de fitato) (0,29 %), potasio (0,37 %) y magnesio (0,14%) que proporcionan casi el 85 % del contenido mineral del grano (Watson, 2008).

II.I.I. Etapas fenológicas

El maíz es de régimen anual cuyo ciclo vegetativo oscila entre los 80-200 días partiendo desde la siembra hasta la cosecha (Parsons, 2008). El crecimiento de la plántula ocurre en un lapso de 8 a 10 días desde que se siembra la semilla hasta la aparición del primer brote. Las etapas de crecimiento son divididas en dos categorías: Vegetativa (V) y Reproductiva (R). Estas etapas son agrupadas en cuatro grandes periodos que comprenden el crecimiento de las plántulas (etapas VE y V1), crecimiento vegetativo (etapas V2, V3... Vn), floración y

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

la fecundación (etapas VT, R0, y R1) y, por último, el llenado de grano y la madurez (etapas R2 a R6). No obstante, el desarrollo del cultivo, dependen en gran medida de la zona y clima en que se realiza la siembra (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados [CIBIOGEM], 2010).

Tabla 1. Etapas de crecimiento del maíz. Tomado de CIBIOGEM (2010).

Etapa	Días*	Características
VE	5	Emerge coleóptilo de la superficie del suelo.
V1	9	El cuello de la primera hoja es visible.
V2	12	El cuello de la segunda hoja es visible.
Vn**	55	El cuello de la hoja n** es visible.
VT		La última rama de la panícula es completamente visible.
R0	57	Antesis o floración masculina. Polen comienza a arrojarse.
R1	59	Estigmas visibles.
R2	71	Etapa de ampolla. Los granos se llenan con un líquido claro. Visibilidad del embrión.
R3	80	Etapa lechosa. Los granos se llenan con líquido lechoso blanco.
R4	90	Etapa masosa. Los granos se llenan con una pasta blanca.
R5	102	Etapa dentada. La parte superior de los granos se llena con almidón sólido.
R6	112	Madurez fisiológica. El grano presenta una humedad relativa de 35% aproximadamente.

Días*, número aproximado de días después de la siembra en tierras bajas tropicales, donde las temperaturas máxima y mínima pueden ser de 33°C y 22°C, respectivamente.

n**, es igual al número definitivo de hojas que tiene la planta, generalmente entre 16 y 22.

II.I.II. Exigencias edafoclimáticas y nutricionales

Temperatura

Dentro de los factores climáticos que intervienen en el desarrollo del maíz se considera la temperatura, en un rango de entre 20 y 29°C, siendo el óptimo de 24 a 26 °C. El maíz llega a soportar temperaturas mínimas de 8°C, sin embargo, temperaturas más bajas pueden aparecer problemas serios debido a mala absorción de nutrientes minerales y agua por lo que puede presentarse un retardo en el crecimiento de la planta. En cuanto a temperaturas altas, pueden tener efectos negativos sobre la fotosíntesis, la traslocación, la fertilidad de las florecillas y el éxito de la polinización.

Riegos

El maíz es un cultivo exigente en agua, en la fase del crecimiento vegetativo es cuando más cantidad de agua se requiere y se recomienda dar un riego 10 a 15 días antes de la floración. En general, en zonas tropicales raramente es cultivado bajo riego y la variabilidad natural en la cantidad y distribución de la lluvia significa que el estrés de sequía puede ocurrir en cualquier momento del ciclo del cultivo (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 1993).

La sequía afecta la producción agrícola en cerca del 60% de las tierras de los trópicos y reducen el rendimiento del maíz anualmente cerca del 15% (Sánchez, Nicholaides, & Couto, 1977). Por el contrario, las inundaciones están asociadas a una menor absorción de nutrimentos como el nitrógeno y potasio (Singh & Ghildyal, 1980). Las inundaciones dan lugar al cierre de los estomas, a un crecimiento limitado, a clorosis, a un menor crecimiento de las raíces y a la muerte de la planta (FAO, 1993).

Suelo

En cuanto a las características del suelo, el maíz no soporta suelos apelmazados o de mal drenaje, por lo que es necesario un suelo profundo, fértil y

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

permeable con un mínimo de 10% de aire, de textura granular y pH entre 5.5 y 6.5 (Torregrosa, 1997).

Fertilización

Por otra parte, las necesidades nutricionales del maíz son de un máximo de 28-30 kg de nitrógeno (N), 10-12 kg de fósforo (P_2O_5), y 23-25 kg de potasio (K_2O), por cada 1.000 kg de grano producido. Adicionalmente, hay un consumo significativo de calcio, magnesio y azufre. Hay que destacar el hecho de que una parte importante de los nutrientes extraídos son destinados a partes de la planta que no siempre se retiran del campo. Esto hace que existan importantes diferencias entre la extracción total de nutrientes y la exportación. Estas diferencias son particularmente importantes en el potasio, en el que sólo una pequeña parte va destinada al grano que se cosecha, y en los microelementos. La deficiencia de nutrientes puede causar un estrés en la planta, en especial el déficit de nitrógeno es el más importante después del déficit de agua (FAO, 2003).

II.I.III. Importancia económica

El maíz (*Zea mays*), es el cultivo más representativo de México por su importancia económica, social y cultural. Existen más de 50 razas, sin embargo, la producción se divide mayormente en maíz blanco y amarillo. Para el año 2019, México ocupaba el octavo lugar a nivel mundial en la producción de este cultivo con más de 28 millones de toneladas anuales (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2020) y el décimo lugar como exportador de maíz grano. A nivel nacional, Sinaloa, Jalisco, México, Michoacán y Guanajuato se posicionan como los principales productores, donde Guanajuato aporta alrededor del 6% total de la producción (Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios, 2018).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

La importancia del cultivo en maíz, de acuerdo con la SADER (2018), se debe principalmente a que es el alimento con mayor peso en el Producto Interno Agrícola con el 14.47%, representa una tercera parte del terreno cultivable del país ya que es sembrado en los 32 estados. Además, presenta una gran variedad de usos por lo que es destinado a diferentes sectores, destacando su uso como forraje o utilización directa del grano o elote como materia prima básica de la industria de transformación, donde se produce almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible (Fideicomiso de Riesgo Comercial FIRCO, 2017).

México se ha convertido en el principal importador de maíz amarillo a nivel mundial alcanzando valores de hasta 15.7 millones de toneladas (Grupo Consultor de Mercados Agrícolas [GCMA], 2019). Comparando las toneladas de maíz importado en el año 2019, para marzo de 2020 las importaciones incrementaron un 5.9% (Grupo Consultor de Mercados Agrícolas (GMCA), 2020).

Las pérdidas económicas debidas al bajo rendimiento del cultivo de maíz, además de ser relacionadas por el estrés promovido por factores abióticos, también es complementado por factores bióticos ya que es atacado por un gran número de patógenos que ocasionan enfermedades en la planta, las cuales pueden ser originadas por hongos, bacterias y virus que generan daños como pudrición de raíz, tallo y hojas antes y después de la floración, inclusive en la etapa de plántula. Aunado a ello, las plantas de maíz pueden ser infectadas a lo largo de su ciclo de vida o post-cosecha por un cierto número de insectos. Dentro de éstos se pueden citar insectos que dañan la semilla en germinación como *Hymelia platura*, insectos del orden de los coleópteros como *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer ocasionando daños en las hojas al igual que la oruga militar tardía o gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) del orden de los lepidópteros siendo este último una de las plagas más importantes del maíz en el continente Americano puesto que en estado larvario ataca en particular a las hojas del verticilo de las plantas, dañan la panoja, los granos en crecimiento y a veces cortan el tallo de las plántulas (FAO, 2019).

II.II. *Spodoptera frugiperda*, una plaga de alto impacto

En algunas regiones de México, como Sinaloa y Guanajuato, la reducción del área foliar en maíz ocurre por la presencia de gusano cogollero (*S. frugiperda*), el cual se presenta durante las etapas vegetativas y es cuando mayor daño foliar ocasiona (Sauceda-Acosta *et al.*, 2015).

S. frugiperda es una especie nativa de occidente de las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, con amplia distribución geográfica (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2019). Esta plaga es conocida generalmente con el nombre de gusano cogollero debido a su acción en el cogollo de la planta. Es una de las plagas que con más frecuencia atacan al maíz, aunque también se encuentra presente en cultivos como algodón, sorgo y zacate bermuda provocando daños superiores al 60% si no es controlado a tiempo (Andrews, 1988). *S. frugiperda* es una plaga polífaga clasificada dentro del grupo de las plagas que pueden causar daños económicos anualmente debido a su presencia durante todo el ciclo fenológico del cultivo (Lezaun, 2016).

II.II.I. Ciclo biológico

Murúa *et al.* (2008), describieron el ciclo biológico de *S. frugiperda* basado en investigaciones previas (Estrada, 2002; Rezende & Cruz, 1994; Valverde *et al.*, 1995), el cual está comprendido entre un periodo de 24 a 40 días (figura 1). Una hembra oviposita entre 600 a 1500 huevos a lo largo de su vida en forma de masas o grupos compactos que promedian de 100 a 150 huevos cada una. El desarrollo del insecto comprende diferentes estadios de crecimiento. Empezando desde la formación del huevo, el desarrollo de la larva, pupa hasta llegar a la etapa adulta en que se convierte en una mariposa.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Huevo o postura

Individualmente son de forma globosa, con estrías radiales, de color rosado pálido que se torna gris a medida que se aproxima la eclosión. En maíz, los huevos son colocados en la parte media de la planta, sobre el envés y/o zona basal de las hojas. El periodo larval dura entre 14- 22 días, abarcando de 6 a 7 instares larvales (Murúa, G. *et al.*, 2009; Valverde *et al.*, 1995).

Larva o gusano

Luego de eclosionadas, las larvas permanecen agrupadas en la parte baja de las plantas, refugiadas entre las hojas, cada agrupación dura aproximadamente 3 días. Las más jóvenes comen durante el día mientras que en los últimos estadios son más activas de noche (Estrada, 2002). En general, son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en el dorso se distingue una banda negra más ancha hacia el costado y otra más debajo de color amarilla; en la frente de la cabeza se distingue una "Y" blanca invertida. Las larvas pasan por 6 ó 7 estadios o mudas, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de control los dos primeros; en el primero estas miden hasta 2-3 mm y la cabeza es negra completamente, el segundo mide de 4-10 mm; las larvas pueden alcanzar hasta 35 mm en su último estadio (Andrews, 1988).

Las larvas consumen en promedio 179.7 cm² de superficie foliar de maíz para completar su desarrollo, dejando de alimentarse justo antes del último estadio larval (Rezende & Cruz, 1994). Si no se lleva un monitoreo adecuado del cultivo, las larvas pueden ser detectadas hasta que se observan daños como la perforación de las hojas al momento de desplegarse.

Pupa

Presenta un color caoba y mide 14 a 17 mm de longitud, con su extremo abdominal terminando en 2 espinas o ganchos en forma de "U" invertida. Esta fase

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

etapa de desarrollo del cultivo en que esta ocurra (Lauer *et al.*, 2004). La mayor presencia poblacional y frecuencia en maíz se registran en las etapas vegetativas iniciales, aquí se observan larvas pequeñas, que producen ruido superficial de la laminas, sin perforarla, conocido como "estado de ventanita", para un eficiente control de cogollero resulta crucial la detección de éste estado de daño grado 1 (ventanita), en este momento la larva está expuesta y es susceptible al contacto con el insecticida, donde se logra la mayor eficiencia de control (Urretabizkaya, 2018).

II.II.III. Estrategias para el control de *S. frugiperda* y mejora del rendimiento del maíz

El maíz se ha convertido en un cultivo sumamente estudiado para la búsqueda de nuevas estrategias o mejoramiento de éstas que permitan el alcance de mayores rendimientos de producción, adquisición de resistencia a cambios climáticos, mayor aprovechamiento del suelo y mayor resistencia y control a insectos plaga. Todo esto con la intención de satisfacer los requerimientos nacionales.

En las últimas décadas, el uso excesivo de plaguicidas ha impactado de manera negativa al ambiente, contribuyendo de igual manera al desarrollo de resistencia de plagas y enfermedades, así como la eliminación de enemigos naturales. Actualmente en la agricultura se hace hincapié en el uso de productos más amigables con el ambiente y la salud humana. En ese sentido, los Agentes de Control Biológico (ACB) constituyen una herramienta importante para el Manejo Integrado de Plagas (MIP), el cual permite a los agricultores vigilar y controlar las plagas en sus campos, reduciendo al mínimo el uso de plaguicidas químicos (Yáñez López *et al.*, 2019) al combinar y compatibilizar las distintas técnicas de control: químico, biológico y cultural, con un enfoque multidisciplinario que mantiene las poblaciones de plagas debajo del umbral de daño económico.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Los plaguicidas biológicos son una de las herramientas fundamentales del MIP, ya que no dejan residuos nocivos para el hombre y el ambiente, y tampoco generan fenómenos de resistencia en los insectos (Roberts, 1989; Lecuona, 1996). Entre los bioplaguicidas de origen bacteriano, la cepa entomopatógena *Bacillus thuringiensis* ha sido el agente de control biológico más utilizado debido a su ubicuidad, fácil manejo y potencial capacidad insecticida debido a sus proteínas insecticidas Cry y Cyt, característica que los clasifica entre los bioinsecticidas más exitosos utilizados en todo el mundo (Barboza Corona *et al.*, 2014).

II.III. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es un bacilo reconocido a nivel mundial por su capacidad entomopatógena y considerado una fuente biosintética de compuestos de importancia biotecnológica; es una bacteria grampositiva, aerobia estricta, que se caracteriza por producir proteínas insecticidas Cry o Cyt en cuerpos paraesporales conocidos como cristales durante su fase de esporulación (Didelot *et al.* 2009), las cuales tienen su efecto tóxico en las células epiteliales del intestino medio de los insectos (Soberón & Bravo, 2007) y tienen la capacidad de actuar en sinergia con otras biomoléculas, tales como quitinasas (Juárez Hernández *et al.*, 2017), proteínas insecticidas vegetativas, proteasas, parasporinas y bacteriocinas (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

II.III.I. Biología

B. thuringiensis presenta dos fases principales durante su ciclo de vida (Helgason *et al.*, 2000): la fase vegetativa o tropofase, donde la duplicación es por bipartición cada 30-90 min; y la fase de esporulación o idiofase, siendo ésta una etapa de diferenciación de bacteria a espora (Soberón & Bravo, 2007) que se presenta ante el estrés de la bacteria por el agotamiento de nutrientes, debido a que

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

estos fueron utilizados en la etapa logarítmica y estacionaria; además, en esta fase comienza la formación del cristal paraesporal (Ponce Moreno, 1995). El ciclo se cierra con la fase lítica, en la que la esporosa y los cristales formados en la etapa de esporulación, se liberan al medio (figura 2).

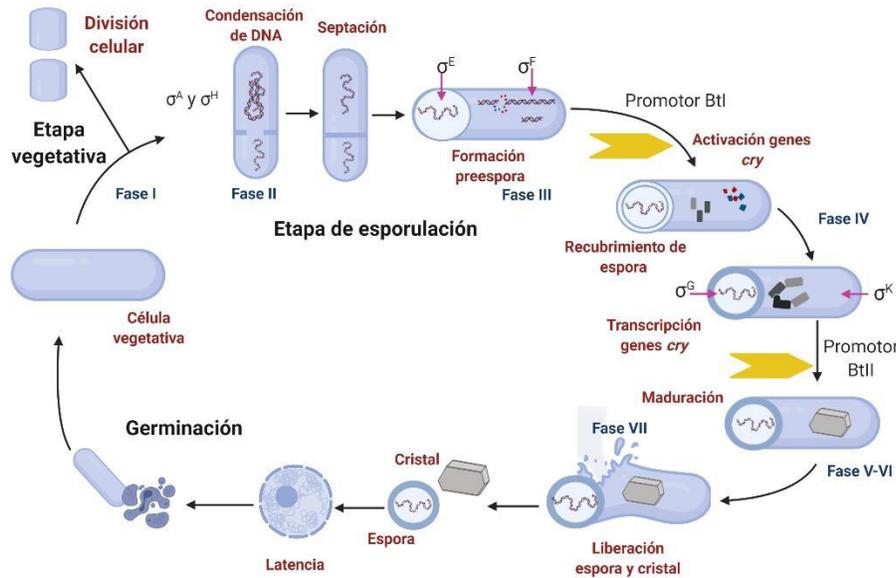


Figura 2. Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*. La etapa de esporulación se divide en 7 fases que implican la formación de la espora, maduración y activación de factores sigma (sigma A, H, E, F, G, y K) que promueven la formación de las proteínas Cry hasta la autólisis celular. La etapa de germinación implica el tiempo en que la espora vuelve a un entorno con condiciones adecuadas que propician la formación de la célula vegetativa y su posterior división celular para dar inicio una vez más al ciclo celular de *Bt*. Adaptado de Errington (2003).

II.III.II. Toxinas Cry de *Bt*

Las δ -endotoxinas tipo Cry son cuerpos paraesporales proteicos conformados por unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, desde 27 a 140 kDa (Crickmore *et al.*, 1998). A nivel estructural, son proteínas globulares de 3 dominios (Bravo, *et al.*, 2007). En general, el dominio I de estas proteínas Cry está formado por 7 estructuras α -hélice, donde una hélice central está rodeada por las otras 6 (figura 3). Este dominio participaría en la formación del poro en la membrana de las células intestinales del insecto susceptible (ver “Mecanismo de acción”) (79, 95, 110). El dominio II está formado por 3 láminas de estructura β en

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

antiparalelo y participaría en la interacción con el receptor, por lo que sería determinante en la especificidad. El dominio III es un β -sandwich en antiparalelo que parecería ser importante para la estabilidad de la toxina, como así también para su especificidad y en la modulación de la actividad de canales iónicos en el intestino medio de los insectos susceptibles (Chen *et al.*, 1993; Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2007).

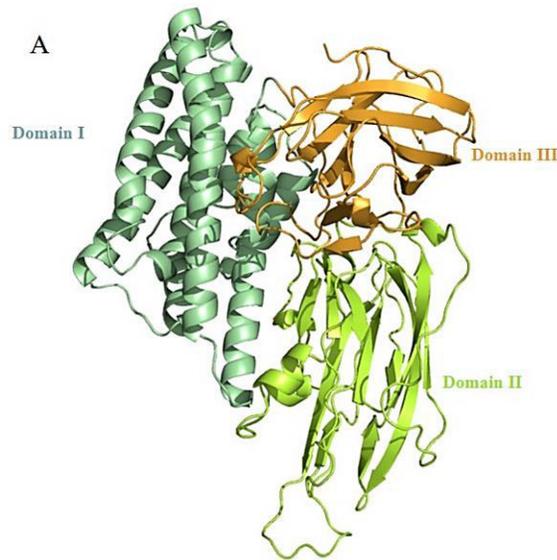


Figura 3. Estructura tridimensional de la toxina Cry1A. La conformación consiste en tres dominios. El dominio I es un paquete de hélice, se propone ser el determinante formador de poros cuando penetran la membrana. El dominio II es un prisma β de tres láminas β

Estas toxinas son altamente específicas para su insecto objetivo, son inocuas para humanos, vertebrados y plantas, y son completamente biodegradables (Bravo *et al.*, 2005). Comprenden al menos 50 subgrupos con más de 200 miembros. La identidad de secuencia primaria entre diferentes secuencias de genes son las bases de la nomenclatura de las proteínas Cry; dependiendo de la similitud se clasifican en cuatro categorías de acuerdo con lo reportado por Crickmore (1998):

1. Categorización incluyendo un número arábigo 45% de identidad (por ejemplo: Cry1, Cry2, etc.)

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

2. Categorización incluyendo una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78% (por ejemplo: Cry1A, Cry1B, etc.)
3. Categorización incluyendo una letra minúscula y corresponde a identidades con 78 a 95% (por ejemplo: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.)
4. Esta última categoría incluye un número arábigo al final de la nomenclatura, indicando más de un 95% de identidad (por ejemplo: Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.).

II.III.III. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 es por excelencia la cepa utilizada para el control de insectos plaga del orden lepidóptera. *Bt* subsp. *kurstaki* HD1 es una de las cepas de *B. thuringiensis* mejor estudiadas y se caracteriza por contener los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia* (Höfte & Whiteley, 1989).

Genes cry1

Los genes *cry1* codifican proteínas de aproximadamente 130 kDa que se agrupan durante la esporulación en inclusiones cristalinas bipiramidales. Estas proteínas son sintetizadas como protoxinas y posterior a un proceso de solubilización debido a las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto y se activan por proteólisis en toxinas de aproximadamente 65 kDa. Los genes *cry1Aa* y *cry1Ac* se localizan juntos en un plásmido de 110 MDa mientras que *cry1Ab* se encuentra dentro de un plásmido más pequeño e inestable de 44 MDa (Carlton & González-JR, 1985).

Genes cry2

Por su parte, los genes del grupo *cry2* carecen del gran fragmento C-terminal presente en otros genes como los de tipo *cry1*. Estos codifican proteínas de 65 kDa que se agrupan en inclusiones cuboidales (Höfte & Whiteley, 1989).

II.III.IV. Mecanismo de acción de proteínas Cry

El mecanismo de acción inicia una vez que éstas son procesadas por proteasas presentes en el intestino medio del huésped (figura 4), separando una sección de aminoácidos en la región N-terminal y en el extremo C-terminal (dependiendo de la naturaleza de la proteína Cry), liberando así fragmentos activos y tóxicos que interactúan con las proteínas receptoras presentes en células intestinales. Estos fragmentos son reconocidos por receptores específicos en la membrana e insertados a través de la caderina con respecto a la toxina Cry1Ac, ésta se une al receptor de tipo aminopeptidasa-N (ANP) por medio del dominio III que reconoce específicamente restos N-acetilgalactosamina (GalNAc), dando sucesión a una serie de señales para la formación de una estructura oligomérica prepore y consecuentemente el poro lítico, por el cual se efectúa un desequilibrio osmótico, que finalmente destruye el epitelio intestinal y por consiguiente la muerte celular (Portela-Dussán *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). La activación de las proteínas Cry también conlleva la digestión de una pequeña porción del extremo N-terminal de la protoxina, evento fundamental para permitir su función tóxica (de Maagd *et al.*, 2003).

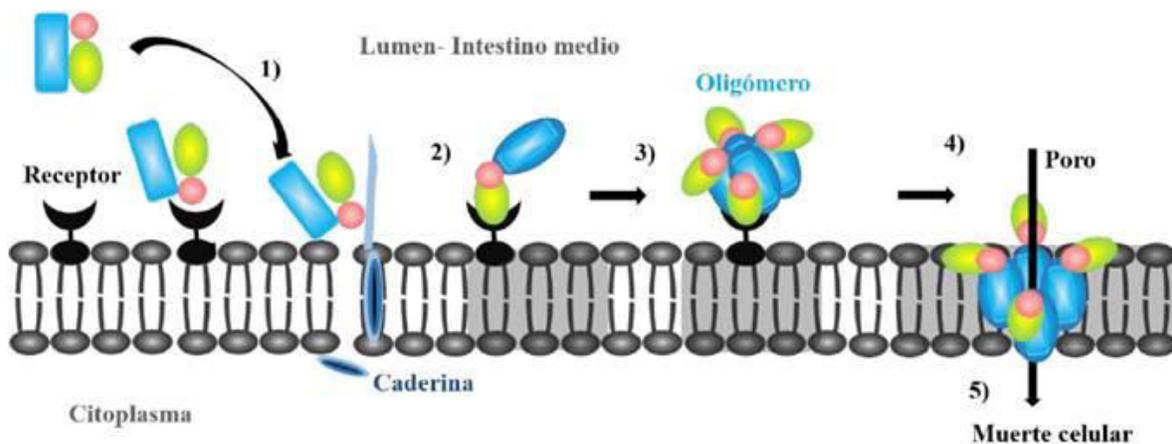


Figura 4. Mecanismo de acción de proteínas Cry. Las proteínas Cry son procesadas proteolíticamente liberando fragmentos activos y tóxicos que interactúan con receptores específicos en la membrana (1) dando sucesión a la formación del pre-poro (2 y 3), consecuentemente el poro lítico (4) efectuando desequilibrio osmótico y destrucción del epitelio intestinal (5) y muerte (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017; Xu *et al.* 2014).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

El alineamiento de las toxinas activas ha revelado la presencia de hasta 5 bloques altamente conservados a lo largo de la secuencia de la gran mayoría de las toxinas Cry (Höfte & Whiteley, 1989). Estas regiones parecen ser determinantes del plegamiento de la proteína, además su alto grado de conservación entre las toxinas Cry se corresponde con la similitud de su estructura tridimensional y su modo de acción (de Maagd *et al.*, 2003; Schnepf *et al.*, 1998).

II.IV. Quitinasas

De acuerdo con la Comisión de Enzimas de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) las quitinasas (EC 3.2.1.14) son enzimas secretadas para hidrolizar el enlace β 1-4 de la quitina. Anteriormente, las quitinasas se dividían en dos categorías que dependían del lugar donde se lleva a cabo la reacción de hidrolisis: exoquitinasas (unión a sitios externos terminales para comenzar la hidrolisis) y endoquitinasas (unión a sitios internos de manera aleatoria) (Lipa, 2003). Su función es hidrolizar la quitina con el fin de emplearla como fuente de carbono y nitrógeno. Pero en estudios realizados a quitinasas provenientes de *B. thuringiensis* se demostró que éstas pueden, además, actuar en sinergia con otros compuestos.

La producción de quitinasa en *B. thuringiensis* se lleva a cabo al inicio de la fase estacionaria (Barboza-Corona *et al.*, 2007). Estas enzimas se producen generalmente a un nivel notablemente más bajo que las toxinas Cry y Cyt, por lo que, a diferencia de éstas, las quitinasas no se acumulan naturalmente como inclusiones intracelulares en las células bacterianas.

De manera general el potenciamiento de la actividad insecticida se fundamenta en que el intestino medio del insecto está recubierto internamente por la membrana peritrófica, cuya estructura está compuesta principalmente de

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

proteínas y reforzada con fibras de quitina, la quitinasa degrada esta barrera permitiendo el paso con mayor facilidad de las proteínas Cry, uniéndose éstas a las moléculas receptoras, propiciando así la formación de poros en el epitelio, causando la muerte del insecto con dosis menores de proteínas Cry (Barboza-Corona *et al.*, 2003; Sampson & Gooday, 1998).

II.IV.I. Quitinasa ChiA74

En particular, en el estudio de ChiA74, una quitinasa sintetizada por una cepa mexicana de *Bacillus thuringiensis* supsp. *kenyae*, se ha demostrado que mejora la actividad insecticida de las proteínas Cry, y puede generar quito-oligosacáridos con actividad antimicrobiana (Juárez-Hernández E. O. *et al.*, 2015). ChiA74, es una enzima soluble con peso molecular de 74kDa, además está conformada por cuatro dominios: la región catalítica (dominio I) con un (α/β)8-TIM-barril como estructura central, el dominio II de inserción de quitinasa, el dominio III de unión a la fibronectina tipo III y el dominio IV de unión a quitina (Juárez-Hernández *et al.*, 2017). Se clasifica dentro de la familia 18 de las quitinasas compuestas, en el subgrupo A que contienen el dominio de inserción de quitina (CBD) (Juárez-Hernández *et al.*, 2019). A medida que se han estudiado las quitinasas de *Bt* se han desarrollado cepas recombinantes que expresen genes de quitinasa generando así sistemas heterologos o bien, cepas de *Bt* con modificaciones que permitan un mayor aprovechamiento de las mismas.

En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo sobre la quitinasa ChiA74, se ha logrado la producción de cuerpos de inclusión de quitinasa y cristales Cry en *B. thuringiensis kurstaki* HD1, mediante la delección del péptido señal (*chiA74* Δ sp) bajo el control del promotor silvestre (*pEHchiA74* Δ sp) o el sistema *pcytA*-STAB obteniendo aumentos de la actividad quitinolítica de hasta 42 veces más en comparación con su parental silvestre, además de obtener mayor actividad insecticida contra larvas de *Manduca sexta* (Barboza-Corona *et al.*, 2014).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

González- Ponce *et al.* en 2017 reportaron que la transformante de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 donde el gen *chiA74* que carece del péptido señal (*chiA74Δsp*) fue insertado en el marco de lectura con la secuencia que codifica el dominio de cristalización C-terminal y el terminador de transcripción de *cry1Ac*, bajo la regulación del sistema promotor *pcytA-p/STAB-SD*, forma inclusiones amorfas aparentemente compuestas de la quimera y cristales bipiramidales nativos de Cry1Ac además de aumentar 51 veces la actividad quitinasa en comparación con HD73 silvestre y reduciendo hasta 30% la concentración letal media (LC 50) en comparación con HD73 de silvestre, lo que indica que el aumento de la toxicidad está directamente correlacionado con la presencia de las inclusiones amorfas de quitinasa-cristal.

II.V. Bacteriocinas

Aunado a la producción de proteínas insecticidas y enzimas líticas, *B. thuringiensis*, tiene la capacidad de sintetizar péptidos antimicrobianos que pueden actuar de manera antagónica contra otras bacterias, estos péptidos son denominados bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005), los cuales se sintetizan de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la etapa (Beristain-Bauza *et al.*, 2012). Las bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* tienen masas moleculares que varían de 3 a 12 kDa, son estables en condiciones ácidas y alcalinas (pH 3-10), y también son termoresistentes, incluso a 121°C (Ahern, 2003). Se han descrito actividades antibióticas Y antifúngicas para bacteriocinas producidas por cepas de *B. thuringiensis* (Cherif *et al.*, 2003).

Actualmente solo se conocen veintiún cepas de *B. thuringiensis* con capacidad para sintetizar bacteriocinas, de las cuales existen dieciocho tipos diferentes, que poseen características muy heterogéneas con respecto al peso molecular, actividad inhibitoria en amplios rangos de pH y temperatura y que además son predominantemente termoestables (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2013).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Las bacteriocinas de esta especie son conocidas como thurincinas, tochicinas, bacthurincinas o entomocinas (Salazar Marroquín *et al.*, 2016).

II.V.I. Thurincina H

Thurincina H, en particular, es una bacteriocina estudiada en nuestro grupo de trabajo debido a la actividad que tiene contra una amplia gama de bacterias grampositivas como *Bacillus spp.*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus* y *Carnobacterium maltaromaticum*. Esta bacteriocina es producida por *B. thuringiensis* SF361, su peso molecular es de 3139.51Da y cuenta con 14 aminoácidos de la secuencia N- terminal idénticos a la thurincina 17 (Lee *et al.*, 2009), bacteriocina en que se ha observado un efecto en la mejora de nodulación, fotosíntesis y crecimiento en plantas de soya (*Glycine max*) al ser aplicada en el cultivo.

II.V.II. Clúster genético de la thurincina H

Los determinantes genéticos para la biosíntesis de thurincina H se ubican en el cromosoma bacteriano y consiste en 10 genes, incluidos tres estructurales de thurincina H (*thnA1*, *A2* y *A3*) dispuestos en repeticiones en tándem (Abriouel *et al.*, 2010). Además de los genes estructurales, río arriba se encuentran *thnR* que codifica para un regulador transcripcional, *thnD* que es una proteína de unión a ATP que codifica para el sistema transportador de ATP, *thnE* codifica para una permeasa y *thnP* que codifica para una serina proteasa líder en el procesamiento de péptidos (Lee *et al.*, 2009; Casados Vázquez *et al.*, 2017). Río abajo de los genes estructurales, se localizan *thnB* que codifica para una enzima radical S-adenosilmetionina (SAM), *thnT* que son proteínas de secreción que codifican para el sistema de transporte de tipo ABC y *thnI* que codifica para una probable proteína de inmunidad (Lee *et al.*, 2009). Cabe señalar que *thnE*, *thnD* y *thnR* son

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

indispensables para la inmunidad de *B. thuringiensis* (Casados Vázquez *et al.*, 2018).

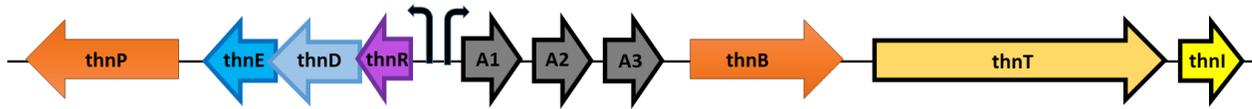


Figura 5. Clúster de la Thurincina H conformado por 10 ORF, incluyendo los tres genes estructurales para la Thurincina H (ThnA1, A2 y A3). Tomado de Casados Vázquez *et al.* (2018).

Los genes estructurales de thurincina H codifican un pre péptido de 40 aminoácidos con un péptido líder de nueve aminoácidos, obteniéndose una bacteriocina madura de 31 aminoácidos (Abriouel *et al.*, 2010). Además, se caracteriza por poseer en su estructura 4 puentes tioéter de azufre con α -carbono diferentes a los asociados con grupos lantionina (puentes de azufre a carbono β) (McAuliffe *et al.*, 2001).

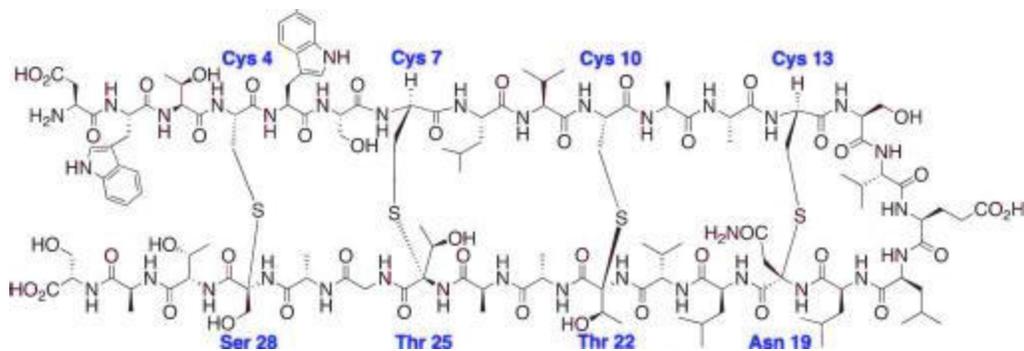


Figura 6. Estructura química de la thurincina H. Tomado de Sit *et al.*, 2011.

II.V.III. Bacteriocinas de Bt con propiedades promotoras de crecimiento vegetal

Se ha reportado que las bacteriocinas y compuestos como lipooligosacáridos y factores de nodulación también pueden aumentar la germinación y el crecimiento de las plantas (Prithviraj *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2002).

Thuricina 17 es la bacteriocina de *Bt* cuyo interés principal radica en su posible aplicación como promotor de crecimiento vegetal (Subramanian & Smith, 2015), ya que al ser aplicada por aspersión o riego a concentraciones nanomolares (nM) puede incrementar el crecimiento de plantas C3 (*Glycine max*) y C4 (*Zea mays*) (Lee *et al.*, 2009). Además de presentar la ventaja de que tanto la bacteriocina como la cepa productora *B. thuringiensis* NEB17 no son tóxicas contra bacterias nitrificantes como *Bradyrhizobium japonicum* 532C (Gray *et al.*, 2006), por lo que, en conjunto pueden utilizarse para incrementar la nodulación de raíces y crecimiento de plantas como la soya (Bai *et al.*, 2003).

Se han reportado cepas mexicanas de *B. thuringiensis* que producen bacteriocinas homólogas a Thuricina 17 (Barboza-Corona *et al.*, 2007), como thurincina H (Casados-Vázquez *et al.*, 2017) y Tolworthicina 524 (Pacheco-Cano *et al.*, 2014) sintetizadas por *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* y *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*, respectivamente. Por lo cual, resulta de gran interés el evaluar su aplicación como promotores de crecimiento vegetal. En estudios recientes, se han llevado a cabo ensayos en donde la aplicación de estas bacteriocinas en semillas de tomate incrementa el porcentaje de germinación y longitud de las mismas (Lafuente Rincón, 2016), lo cual da pie a la búsqueda de concentraciones óptimas para su uso como promotores de crecimiento vegetal.

Mecanismo de acción

Para dilucidar el modo de acción, se han propuesto algunos mecanismos por los cuales las rizobacterias tienen un efecto promotor del crecimiento en plantas

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

(PGRP), tal es el caso del biocontrol de fitopatógenos atribuido a diferentes sustancias sintetizadas por la bacteria como antibióticos, enzimas líticas y bacteriocinas, siendo éstas últimas útiles para el control de un amplio rango de bacterias que pueden alojarse en diferentes partes de la planta, llegando a ocasionar daños severos en las mismas. No obstante, la interacción entre planta-bacteriocina va más allá de esta ventaja competitiva cuyo modo de acción involucra al órgano en el cual se da el contacto directo. Para el caso de la hoja se cree que la respuesta se transmite dentro de la planta mediante una cascada de señales y una respuesta de tipo hormonal que induce un mejor desarrollo de la misma (Lee *et al.*, 2009). Por otra parte, se han estudiado productos de genes relacionados con la patogénesis (PR) como enzimas involucradas en la redirección del flujo de carbono del metabolismo primario al secundario en las plantas, como los genes que codifican para fenilalanina-amoniaco-liasa (PAL), peroxidases (POD), lipooxigenasas (LOX), superóxido dismutasas (SOD) y polifenol oxidasas (PPO), una enzima clave en la síntesis de compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana (Jung *et al.*, 2011), en los cuales se ha identificado un incremento significativo cuando la planta ha sido tratada con bacteriocina, específicamente Thuricina 17 y Bacthuricina F4.

III. JUSTIFICACIÓN

La importancia del maíz en México es a nivel económico, social y cultural. Por lo que, los factores bióticos y abióticos que afectan el rendimiento productivo deben ser minimizados. En especial factores bióticos como insectos-plaga, siendo *Spodoptera frugiperda* la causante de pérdidas que pueden afectar hasta el 60% del cultivo ya que se manifiesta desde la etapa de plántula hasta el periodo de madurez de este. Actualmente, se ha optado por la implementación de estrategias de control a través del Manejo Integrado de Plagas (MIP) y el uso de Agentes de Control Biológico (ACB), para tratar de erradicar la presencia de la plaga y al mismo tiempo disminuir el uso de agentes químicos. *B. thuringiensis* es la bacteria entomopatógena con mayor éxito en el mercado de los bioplaguicidas debido a la producción de proteínas insecticidas Cry específicas para diferentes órdenes de insectos plaga. Aunada a la producción de proteínas insecticidas, *Bt* representa una fábrica para la síntesis de productos de importancia biotecnológica como quitinasas que en conjunto con las proteínas Cry puede incrementar la actividad insecticida, o bien la síntesis de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) que se ha reportado su participación como promotores de crecimiento y tolerancia al estrés salino de cultivos meramente importantes para el sector agrícola. Por lo cual el generar un producto integrado por cristales Cry1Ac, quitinasa ChiA74 y thurincina H sintetizados en fase de esporulación resultará viable para su aplicación como agente insecticida contra *S. frugiperda* y promotor de crecimiento en maíz durante la etapa de germinación o bien, en la etapa vegetativa.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

IV. HIPÓTESIS

Bacillus thuringiensis HD1 transformada con los genes ChiA74 y pThur regulados bajo el promotor fuerte pCyt-STAB produce el cristal insecticida Cry1Ac, la quitinasa ChiA74 y thurincina H en la etapa de esporulación en concentraciones adecuadas para que efectúen su actividad.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la cepa de *Bacillus thuringiensis* recombinante productora de las proteínas Cry1Ac, ChiA74 y thurincina H en la etapa de esporulación como bioestimulante y agente de control biológico.

V.I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los tiempos de producción de las proteínas Cry1Ac, ChiA74 y thurincina H en la cepa recombinante de *B. thuringiensis*.
2. Evaluar el efecto específico de cada proteína (Cry1Ac; formación de cristales, ChiA74; actividad enzimática, thurincina H; actividad antimicrobiana) producida por *Bacillus thuringiensis* HD1 recombinante.
3. Evaluar el efecto de la thurincina H sobre la germinación y desarrollo de plantas de maíz en condiciones de estrés salino.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.I. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1, y *B. thuringiensis* Cry⁻B con sus respectivas transformantes, se cultivaron en medio de soya tripticaseína (TSB) o agar de soya tripticaseína (TSA) a 28°C con una agitación de 200 rpm durante 16 h según fuera conveniente.

La cepa de *Bacillus cereus* 183 utilizada para el ensayo de actividad en pozos, fue crecida en medio TSB a 28°C durante 16 h con una agitación de 200 rpm.

VI.II. Evaluación de la producción del complejo espora-cristal, quitinasa y bacteriocina

Como precultivo, se inoculó una colonia de la recombinante de *Bt* HD1 con la construcción pSTAB-pThurH/ChiA74dsp) en 5 ml de TSB suplementado con eritromicina (25µg/mL) y cloranfenicol (5µg/mL). Se incubó 16 h a 28°C y 200 rpm. Bajo las mismas condiciones se cultivaron 3 cepas destinadas como controles (véase tabla 2) en TSB, variando únicamente el antibiótico con el que fue enriquecido el medio (cepa silvestre sin antibiótico, cepa con vector pHT3101 con eritromicina a 25 µg/mL y cepas con el vector pPG con cloranfenicol a 25 µg/mL).

Tabla 2. Cepas utilizadas para la evaluación de la sincronización de proteínas Cry1Ac, ChiA74dsp y thurincina H.

Nombre	Acrónimo	Cepa de Bt	Vector de expresión	Sobre expresa
Silvestre	WT	HD1	no	---
pHT3101/pPG	VV	HD1	no	---
pSTAB/Thur	Thur	HD1	si	Thurincina H
pSTAB-ChiA74dsp/Thur	Thur/ChiA	HD1	si	Thurincina H/ Quitinasa ChiA74

VI.II.I. Actividad antibacteriana de thurincina H

Partiendo de un mililitro de cada precultivo se inocularon 200 mL de TSB con o sin antibiótico, dependiendo de la cepa y su construcción, por triplicado. Se incubaron a 28°C y con agitación de 200 rpm por 96 h (tiempo en que se observó lisis celular). Cada 12 horas se tomaron alícuotas de 25 mL las cuales se centrifugaron a 6000 rpm por 25 min. En cada toma de muestra, se midió densidad óptica (D.O._{600nm}) para monitorear el crecimiento de cada cepa. La pastilla se utilizó para determinar actividad quitinolítica y producción de cristales. Para probar la actividad antibacteriana los sobrenadantes fueron tratados con sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ al 40% de saturación, se dejaron en agitación durante 16 h a 28°C, una vez pasado el tiempo se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 minutos y los botones fueron resuspendidos en buffer de fosfatos pH 6.8 50 mM (K₂HPO₄, KH₂PO₄), se dializaron durante toda la noche en el mismo buffer. Para la diálisis se utilizó una membrana con corte de 3.5 kDa (Spectra/Por® 3 Dialysis membrane). Los extractos crudos dializados se cuantificaron mediante Bradford.

La actividad de la bacteriocina se determinó por el método de difusión en pozos. Para ello, se mezclaron 20 ml de agar de pozos con 140 µl de una suspensión (500 µL de precultivo de *B. cereus* 183 en 4.5 mL TSB) de 2 horas de crecimiento de la cepa indicadora (Suspensión que partió de una colonia crecida durante 16 h en 5 ml de TSB). Se realizaron pozos de 7mm de diámetro en las placas de agar para adicionar a cada pozo 90 µl de los extractos crudos dializados tomados a las diferentes horas. Las placas se incubaron durante 16 h a 4°C para permitir la difusión de las muestras. Finalmente, los cultivos se incubaron a 28°C durante 1 día y después se midieron los diámetros de las zonas de inhibición y se calculó la actividad específica en relación con el diámetro de inhibición y proteína total.

VI.II.II. Monitoreo de la formación de cristales insecticidas

El cultivo se monitoreó durante un periodo de 96 h para visualizar esporas y cristales mediante microscopía (ZEISS AXIO). Una vez determinados los tiempos de formación de cristal, las pastillas (previamente congeladas) provenientes de las 60 h, 72 h, 96 h y 120 h se monitorearon por electroforesis SDS-PAGE. Éstas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril y posteriormente fueron resuspendidas en 100 μ L de buffer de carga Laemmli 2x y hervidas durante un periodo de 10 min para posteriormente centrifugar a 13 000 rpm por 10 min.

Los geles de poliacrilamida al 10% se prepararon con 1.9 mL de agua destilada, 1.3 mL de Tris base pH 8.8 1 M, 1.7 mL de acrilamida al 30%, 50 μ L de SDS 10%, 50 μ L de PSA 10% y 6 μ L de TEMED para la parte concentradora. La parte separadora fue preparada con 1.4 mL de agua destilada, 250 μ L de Tris base pH 6.8 1 M, 330 μ L de acrilamida al 30%, 20 μ L de SDS 10%, 20 μ L de PSA 10% y 5 μ L de TEMED. Se cargaron 10 μ L de cada muestra en el gel y se corrió la electroforesis a 120 V durante un tiempo aproximado de 1 hora. Posteriormente, el gel se tiñó con azul de Coomassie y fue incubado a temperatura ambiente con agitación durante 25 min, por último, se destiñó con una solución de ácido acético al 10%.

VI.II.III. Recuento de esporas

Alícuotas de 1 mL de cultivo de 72 h (tiempo de sincronización) y 96 h (tiempo de autólisis) fueron incubadas a 60 °C durante 20 min para destruir cualquier célula vegetativa restante (Park, Delécluse, & Federic, 2001). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se consideraron las correspondientes a 10^{-6} para ser crecidas en Agar nutritivo con o sin antibiótico e incubadas a 28°C durante 24 h para determinar el número de esporas viables producidas por cada cepa (Barboza-Corona, *et al.*, 2009). Los datos fueron analizados mediante un ANOVA simple con el programa (STATGRAPHICS Centurion XVI).

VI.II.IV. Determinación de la actividad quitinolítica

Las pastillas recolectadas se utilizaron para determinar actividad quitinolítica; éstas fueron resuspendidas en buffer de fosfatos pH 6.8 100 mM, y sometidas a ultrasonidos por 2 min a 40% de amplitud del máximo, con pulsos de encendido de 9 s y tiempos de descanso de 4 s utilizando un procesador ultrasónico de 20 kHz (Disruptor de células ultrasónicas, BIOBASE, China). Se centrifugaron a 13 000 rpm para eliminar el detritus celular y el sobrenadante fue cuantificado por el método de Bradford para determinar proteína total. El ensayo de actividad por fluorescencia se realizó a partir de la adición de 150 μ l de buffer de fosfatos 100 mM pH 6.8, 25 μ l de sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil β -D-N,N',N'-Triacetil Quitotriosa) a 10 μ M y 25 μ l de la enzima; posteriormente se incubó a 37°C por 30 min y se añadieron 50 μ L de Na₂CO₃ para detener la reacción. Para la lectura de la actividad se utilizó un lector multimodo de microplacas (Synergy™ HTX, BioTek™) programado a una longitud de onda de 360 nm de excitación y 440 nm de emisión. Para determinar la actividad enzimática específica se utilizó una curva estándar de 4-metilumbeliferona. Se definió una unidad (U) de actividad quitínolítica a la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de 4-metilumbeliferona en 1 h.

VI.III. Determinación de la actividad promotora de crecimiento de thurincina H en la etapa de germinación del maíz (*Zea mays*)

VI.III.I. Purificación parcial de Thurincina H

Thurincina H fue producida por la cepa recombinante *Bt Cry⁻B/pThur* (cepa transformada con clúster genético de la thurincina H en el vector pHT3101). *Cry⁻B/pThur* a 28 °C fue cultivada en un volumen de 400 ml de TSB durante 24 h a 28 °C y 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 6000 rpm/20 min a 4°C, y el sobrenadante se precipitó como se describió previamente; la pastilla fue resuspendida en agua

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

destilada estéril y dializada en la misma durante 16 h. La muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual se fraccionó usando una membrana de corte de 30 kDa (Amicon) hasta que el 90% fluyó a través de la membrana. Debido a la formación de aglomeraciones por parte de la thurincina H, se recuperó la fracción correspondiente a un peso mayor a 30 kDa. Alícuotas de 1.5 mL fueron tratadas con ultrasonidos por 2 min o hasta formar espuma a 40% de amplitud del máximo, con pulsos de encendido de 9 s y tiempos de descanso de 4 s utilizando un procesador ultrasónico de 20 kHz. Posteriormente, el sobrenadante se pasó a través de un filtro de polietersulfona de 0,45 µm (Merck Millipore Ltd, Tullagreen Carrigtwohill C. Cork Irl.) para evitar presencia de contaminantes. Se corroboró actividad por el método de difusión en pozos (Barboza-Corona et al. 2007).

VI.III.II. Purificación de thurincina H por FPLC

Se cargó un ml de la fracción que contenía la thurincina H filtrada, en una columna Superdex 30 previamente equilibrada con agua destilada filtrada (filtro de polietersulfona de 0,45 µm) y estéril. La Thurincina se separó mediante cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad, FPLC por sus siglas en inglés (Biological-Duo-Flow Pathfinder 20 System BioRad, Hercules CA, EE. UU.). Las fracciones se recolectaron a una velocidad de 1 mL / min, se consideraron 10 fracciones por debajo de la fracción 38 (fracción que exhibe un aumento en la UV y en la conductividad eléctrica) y 10 fracciones por arriba de la fracción 38, para corroborar la presencia de thurincina H por el método de difusión en pozos. Posteriormente, las fracciones con actividad se analizaron mediante dos geles de poliacrilamida al 16% (SDS-PAGE) usando buffer tris-tricina (Schägger, 2006); un gel se tiñó con plata y el otro se analizó mediante el ensayo de actividad por sobrecapa, para lo cual se fijó por 50 min con solución de fijado (20% isopropanol, 10% ácido acético, 70% H₂O), se lavó con agua destilada 6 veces cada 10 min; después del último lavado, se equilibró con buffer de fosfatos 100 mM pH 7 por 10

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

min, el gel se colocó en una caja de Petri y se le añadieron 10 ml de agar de pozos con 70 µl de un cultivo de 2 h de la bacteria indicadora (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

VI.III.III. Cuantificación de thurincina pura

Thurincina H fue cuantificada mediante un espectrofotómetro (NanoDrop™ Lite, Thermo Scientific), cuya absorbancia se leyó por triplicado a 280 nm de longitud. Para el cálculo de la concentración de proteína purificada se consideró el coeficiente de extinción molar (ϵ molar) y peso molecular de thurincina H (11250 y 3,147.6 g/mol, respectivamente). Considerando las siguientes fórmulas:

$$\text{Concentración (mg/ml)} = \frac{\text{Absorbancia}}{\epsilon 1\%} * 10$$

$$\epsilon_{\text{molar}} * 10 = (\epsilon 1\%) * (\text{mw proteína})$$

VI.III.IV. Obtención de extractos crudos de Cry⁻B silvestre

Cry⁻B/pThur, Cry⁻B Δ ThnA

El extracto crudo que contiene thurincina H fue producido por la cepa recombinante de Bt Cry⁻B/pThur; se utilizaron como controles negativos los extractos crudos provenientes de la mutante Cry⁻B Δ ThnA (cepa transformada con clúster genético de la thurincina H sin los genes estructurales ThnA1A2A3 en el vector pHT3101) y de Cry⁻B silvestre. Los extractos se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.2.1. Se utilizó buffer de fosfatos 50 mM (KH₂PO₄, K₂HPO₄) para dializar y resuspender los extractos crudos, una vez dializados, se almacenaron a -20°C hasta su uso.

VI.III.V. Cuantificación por el método de Lowry modificado

Los extractos crudos se cuantificaron por triplicado por el método de Lowry modificado (Modified Lowry Protein Assay Kit, Thermo Scientific™ Pierce™), considerando una curva estándar de albúmina bovina (BSA) para determinar la concentración de proteína de cada muestra. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 40 µL de cada estándar. Se adicionaron 200 µL del reactivo modificado de Lowry inmediatamente y se mezclaron durante 30 s. La placa se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Posteriormente se adicionaron 20 µL de reactivos 1x Folin-Ciocalteu (se diluyó el reactivo 2x con agua destilada ultrapura en relación 1:1), se mezcló perfectamente e incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Para la lectura del contenido de proteína total, se utilizó un lector multimodo de microplacas (Synergy™ HTX, BioTek™) programado a una longitud de onda de 750 nm de longitud.

VI.III.VI. Evaluación de la estabilidad de thurincina H

Alícuotas de 1 mL de extracto crudo proveniente de Cry⁻B/pThur fueron dializadas durante un periodo de 16 h en agua bidestilada para la eliminación de sales. Posteriormente, dos alícuotas fueron almacenadas a temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$). La actividad antibacteriana fue determinada mediante el método de difusión en pozos, depositando alícuotas de 90 µl, por duplicado en cada pozo, la actividad antibacteriana se monitoreo durante un periodo de 43 días.

Por otra parte, una alícuota de 2 mL del extracto crudo fueron destinadas para el proceso de liofilizado. La alícuota se vortexeó durante 30 segundos y, ésta se separó en alícuotas de 1 mL a las cuales se les realizó un ensayo en pozos para determinar que la actividad antimicrobiana fuera la misma. Posteriormente un mL se consideró como control, mientras que el mililitro restante se sometió a un proceso de liofilizado. Finalmente, la muestra liofilizada fue resuspendida en 910 µL de agua

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

bidestilada estéril y se comprobó la actividad antibacteriana, utilizando el control no liofilizado.

VI.III.VII. Establecimiento de las condiciones óptimas para la aplicación de extractos crudos en maíz

Se establecieron tres concentraciones basadas en el contenido de proteína total y en las unidades de actividad inhibitoria contra la cepa sensible (tabla 4). Considerando que la concentración de 80µg/ mL (tratamiento 3 “T3”) representa las unidades de actividad inhibitoria que se obtuvieron de la cepa de HD1 pSTAB-pThurH/ChiA74dsp en el tiempo de sincronización. La germinación se efectuó bajo estrés salino; se utilizaron 3 concentraciones de NaCl (50, 100 y 200 mM) basadas en las condiciones probadas por Subramanian y colaboradores (2016); como control se realizó la germinación con agua.

Tabla 3. Establecimiento de concentraciones de thurincina H para su aplicación en la etapa de germinación de *Zea mays* en condiciones de estrés salino.

Concentración NaCl (mM)	Actividad antimicrobiana (U)	Proteína Total (µg/mL)		
		Cry ⁻ B pThur	Cry ⁻ B Silvestre	Cry ⁻ B -ThnA
50 mM	440	222	222	222
	250	110	110	110
	150*	80*	80	80
100 mM	440	222	222	222
	250	110	110	110
	150	80	80	80

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Concentración NaCl (mM)	Actividad antimicrobiana (U)	Proteína Total (µg/mL)		
		Cry ⁻ B pThur	Cry ⁻ B Silvestre	Cry ⁻ B -ThnA
200 mM	440	222	222	222
	250	110	110	110
	150	80	80	80
Control H2O	---	---	---	---

El cálculo de las concentraciones partió de las Unidades de actividad inhibitoria del extracto crudo de Cry⁻B pThur, de esta manera se relacionó la cantidad de proteína total que representaba cada concentración con los controles Cry⁻B silvestre y Cry⁻B-ThnA.

***La concentración 80 µg/ mL corresponde a la proteína total que se obtuvo de la cepa doblemente transformada (pSTAB-pThurH/ChiA74dsp) a las 72 h.**

Desinfección de las semillas

Para los ensayos se utilizaron semillas de maíz blanco B-937 (Biosemillas), las cuales se hidrataron 1 hora con agua destilada estéril seguido de tres lavados. Posteriormente se desinfectaron por inmersión en etanol al 80% durante un minuto y se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril. Seguidamente se agregó hipoclorito de sodio al 20% por 15 minutos y se lavaron tres veces en condiciones de esterilidad para eliminar la mayor parte de los productos químicos de la certificación de las semillas.

Aplicación de extractos crudos en etapa de germinación

Sobre un papel filtro Whatman embebido previamente con 2 mL de cada solución y colocado en cajas de Petri de 8.5 cm de diámetro, se colocaron 5 semillas desinfectadas, considerando un total de 30 semillas por tratamiento. Las semillas fueron puestas a germinar en un fotoperiodo de 16:8 (luz oscuridad) a 28°C y 76±10% humedad relativa ambiental por un tiempo de 96 horas. Finalmente, se

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

registró el porcentaje de semillas germinadas y la longitud radicular. Se consideró como semilla germinada aquella que presentó desarrollo radicular y emergencia del hipocótilo.

Para la evaluación estadística se realizó un diseño experimental completamente al azar. Los datos de germinación de semillas y longitud radicular fueron analizados por la prueba estadística de Tukey con un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

VI.III.VIII. Ensayo de actividad promotora de crecimiento bajo condiciones de estrés salino

Se consideró el tratamiento de Cry⁻B/pThur que presentó un efecto positivo para la germinación del maíz para ser aplicado en 60 semillas de maíz blanco B-937 (Biosemillas), previamente desinfectadas, así como sus respectivos controles (H₂O, Cry⁻BΔThnA, Cry⁻B silvestre). Es importante mencionar, que de acuerdo con el ensayo anterior (7.3.8) se observó una disminución en las semillas tratadas con Buffer de fosfatos 50 mM por lo que los siguientes extractos crudos fueron dializados y resuspendidos en agua destilada estéril. Se colocaron 5 semillas sobre un papel filtro embebido con 2 ml de cada tratamiento sobre una caja de Petri. Las semillas fueron puestas a germinar en un fotoperiodo de 16:8 (Luz: oscuridad) a 28°C y 76±10% humedad relativa ambiental por un tiempo de 96 horas. Cumplido el tiempo de germinación, se registró el porcentaje de semillas germinadas y la longitud radicular.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

VI.III.IX. Comparación del efecto promotor de crecimiento entre thurincina H pura y extracto crudo.

Hasta el momento, el tratamiento 3 (T3) de Cry⁻B/pThur presentó mejoras en el desarrollo del maíz por lo que fue considerado para compararlo con el tratamiento de thurincina H pura 5×10^{-9} M (Lee *et al.*, 2009) para determinar el grado de pureza de thurincina H necesario para ser aplicado. Aunado a estos dos tratamientos, se consideró el extracto crudo de Cry⁻B/pThur considerando una concentración teórica de thurincina H de 5×10^{-9} M, la cual fue calculada en relación con el contenido de proteína total y las unidades de actividad inhibitoria con respecto a las unidades presentadas por thurincina H purificada por FPLC. A manera de monitoreo, el grado de pureza se observó mediante dos geles de poliacrilamida al 16% (SDS-PAGE) usando buffer tris-tricina (Schägger, 2006); un gel se tiñó con plata y el otro se analizó mediante el ensayo de actividad por sobrecapa (Barboza-Corona *et al.*, 2007). Una vez comprobada la pureza y actividad de las muestras, se llevó a cabo el ensayo de germinación, utilizando 100 semillas por tratamiento. Las cuales fueron desinfectadas y crecidas de acuerdo con lo descrito en los ensayos previos, únicamente con la modificación en el fotoperiodo, puesto que se mantuvieron en completa oscuridad durante 96 h.

Tabla 4. Aplicación de thurincina H con diferentes grados de pureza en maíz blanco B-903 durante la etapa de germinación.

	Control H ₂ O	Thur 5×10^{-9} M	E.C.5 5×10^{-9} M	Tratamiento 3 (T3)
Tratamiento previo	----	Muestra purificada por columna de exclusión molecular.	Sobrenadante dializado y centrifugado a 13 000 rpm	Sobrenadante dializado y centrifugado a 13 000 rpm
Concentración	----	5×10^{-9} M	5×10^{-9} M	80 µg/mL

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

A la par, para comprobar que el efecto promotor de crecimiento era debido a thurincina H, semillas de maíz blanco fueron tratadas con thurincina H pura a una concentración de 5×10^{-9} M en combinación con los extractos crudos de Cry⁻B silvestre y Cry⁻B Δ ThnA en concentraciones de 40, 80, 120 y 160 μ g/ mL de proteína total (tabla 5). Por tratamiento, se consideró un total de 40 semillas, colocando 5 semillas por caja de Petri, éstas fueron crecidas a 28 °C, durante 96 h en completa oscuridad. Se utilizaron semillas germinadas con agua y semillas tratadas con thurincina H pura 5×10^{-9} M como controles individuales (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de extractos crudos y Thurincina H aplicados a maíz durante la etapa de germinación.

Tratamiento	Proteína total (μ g/mL)	Control (Sin Thurincina H)	Thur 5×10^{-9} M
H ₂ O	---	---	---
Thur 5×10^{-9} M	---	---	Si
Cry ⁻ B silvestre	40	Si	Si
	80	Si	Si
	120	Si	Si
	160	Si	Si
Cry ⁻ B Δ ThnA	40	Si	Si
	80	Si	Si
	120	Si	Si
	160	Si	Si

*A cada concentración de los dos extractos crudos corresponde un control, los cuales no presentan actividad antibacteriana debido a la ausencia de thurincina H (Columna 3, de izquierda a derecha).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.I. Determinación del tiempo de producción de quitinasa, bacteriocina y proteína Cry1A en la cepa recombinante de Bt HD1 pSTAB-ChiA74dsp/ThurH.

VII.I.I. Cinética de crecimiento

Las cepas recombinantes serán mencionadas de acuerdo con el acrónimo mencionado en materiales y métodos. Se analizó el crecimiento de las cepas de Bt HD1 WT, VV, Thur y Thur/ChiA, mediante un monitoreo por 96 h (figura 7). La fase exponencial para las cepas HD1 WT, Thur y Thur/ChiA finalizó hasta las 36 h, excepto en la cepa recombinante HD1 VV, cepa que comenzó la fase de muerte celular a las 60 h. La fase estacionaria comenzó a las 24 h y terminó a las 60 h para todas las cepas evaluadas. HD1 Thur presentó un comportamiento similar a la cepa WT, las cuales mantuvieron un comportamiento exponencial y estacionario sin llegar a la muerte celular durante el tiempo evaluado.

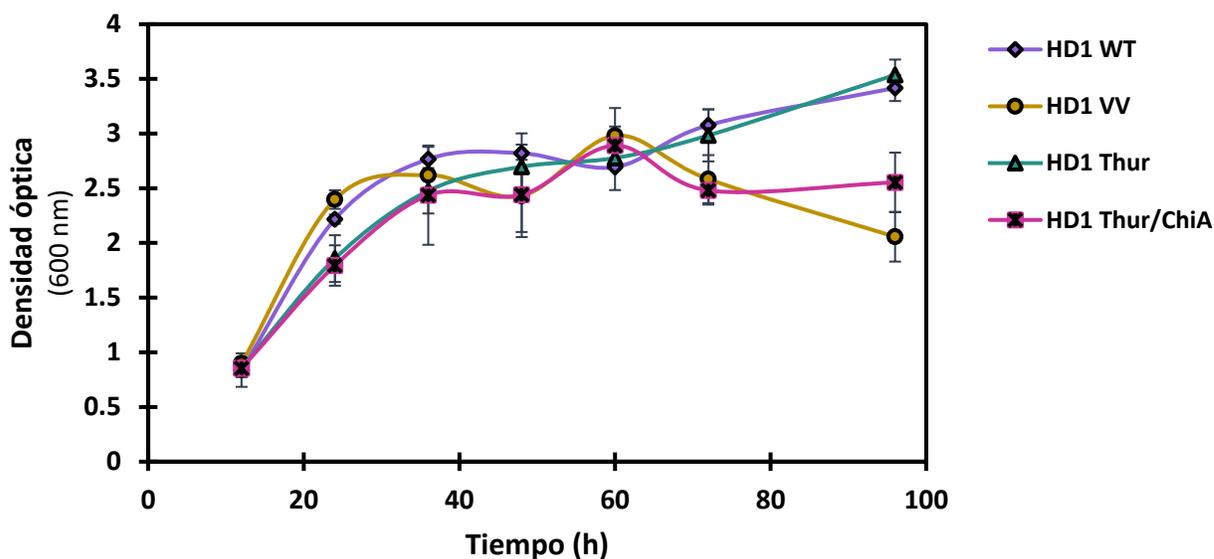


Figura 7. Cinética de crecimiento de las cepas de *B. thuringiensis*: HD1 WT, VV, Thur y Thur/ChiA durante 96 h.

VII.I.II. Determinación del tiempo de sincronización en la producción del complejo espora-cristal, quitinasa y bacteriocina.

HD1 Thur/ChiA al estar regulada bajo un promotor fuerte de esporulación (pCyt) y una secuencia estabilizadora (STAB) tiene la capacidad de promover la síntesis de thurincina H en concentraciones superiores respecto a la cepa silvestre inclusive en la etapa de esporulación, tiempo en el que la bacteriocina ya no es producida de manera natural (figura 8). De igual manera, HD1 Thur/ChiA tiene la capacidad de sintetizar quitinasa ChiA74 en cantidades de hasta tres veces superior a la quitinasa sintetizada de manera basal en HD1 WT (figura 9).

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana fue definida como las unidades necesarias para inhibir la cepa sensible (*B. cereus* 183) en un mm²; ésta se determinó partiendo del área de inhibición de la bacteria indicadora, obtenida por el método de difusión en pozos y la cuantificación total de proteínas por el método de Bradford. La mayor actividad antimicrobiana se presentó a las 24 y 36 h para todas las cepas, mientras que a las 96 h ya se había perdido por completo (figura 8). Siendo las 60 h el último periodo de síntesis de thurincina H registrado para las cepas HD1 silvestre (WT) y con vectores vacíos (VV), mientras que para las cepas transformadas con el clúster genético de la bacteriocina regulado por un promotor de esporulación (pCyt) se logró obtener thurincina H hasta las 72 h de crecimiento (HD1 Thur y HD1 Thur/ChiA).

De manera general, la mayor actividad antibacteriana se presentó en la cepa HD1 Thur a las 24 h (~32,000 U/mg) y la menor actividad a las 60 h en HD1 WT (~6,500 U/mg). Por otra parte, la recombinante HD1 Thur/ChiA presentó la mayor actividad a las 24 h (~19,500 U/mg), pero ésta fue menor en comparación con las demás cepas, sin embargo, en el periodo comprendido entre las 60 y 72 h al igual que HD1 Thur, presentaron los valores más altos de actividad (~15,000 y 18,000 U/mg, respectivamente).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

El comportamiento de las cepas es similar a ensayos previamente realizados en nuestro grupo de laboratorio (Bravo-Rivas, datos sin publicar) para las cepas de estudio, en donde se reporta que la cepa recombinante HD1 pSTAB/pThur/ChiA74dsp (aquí denominada HD1 Thur/ChiA) tiene la capacidad de sintetizar thurincina H en la etapa de esporulación, aproximadamente a las 60 h con una actividad que oscila entre las 9,000 U/mg, lo que sugiere que puede ser obtenida en un tiempo en el que la cepa ya ha sintetizado el complejo espora-cristal, así como la quitinasa. Se propone que tanto HD1 Thur y HD1 Thur/ChiA al utilizar un promotor de esporulación (pSTAB) que regula los genes estructurales de la thurincina H (ThnA1,A2,A3), origina cambios en sus niveles de expresión en la etapa de esporulación (Bravo-Rivas, datos sin publicar).

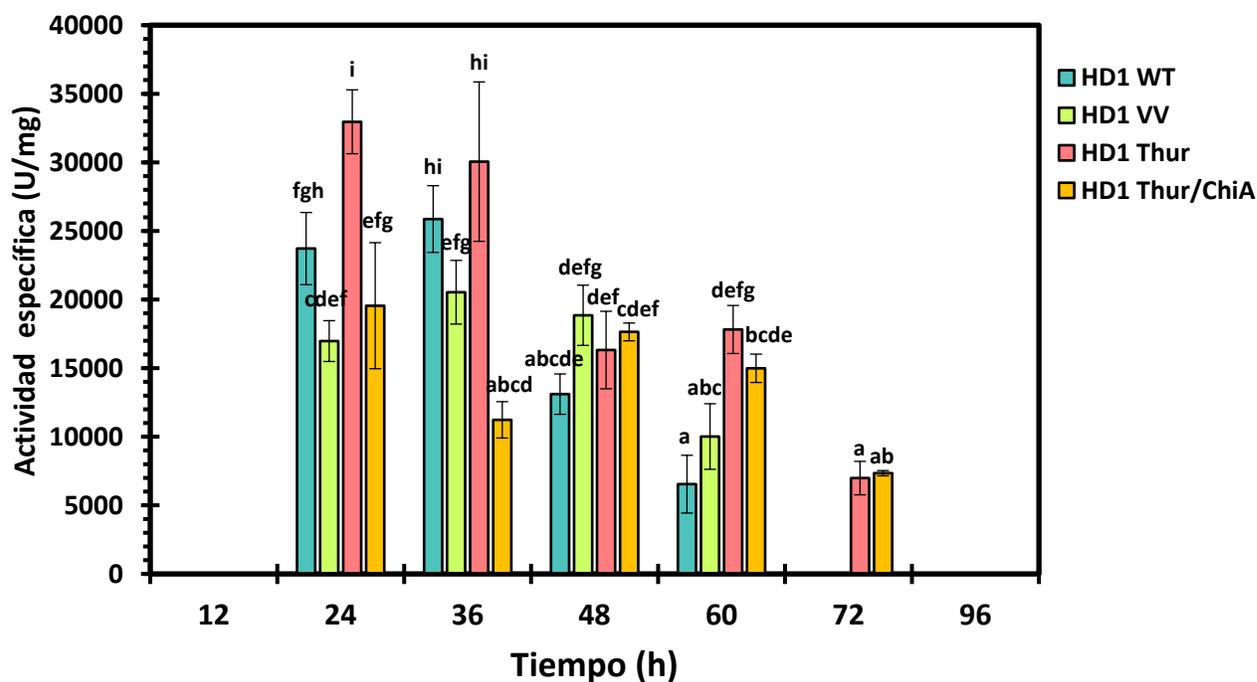


Figura 8. Actividad específica de la cepa recombinante HD1/pSTAB-pThur/ChiA74dsp (HD1 Thur/ChiA) y sus respectivos controles (HD1 WT, VV y Thur). Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre cada cepa ($P \leq 0,05$). Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar.

Con base en los resultados, se consideró como posible tiempo de sincronización las 72 h, último tiempo registrado para la síntesis de thurincina H en la cepa de interés (HD1 Thur/ChiA). Cabe mencionar que la cantidad de thurincina

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

H producida en este tiempo es suficiente para ver efectos antibacterianos y promotores de crecimiento, como se mostrarán más adelante.

Actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó mediante el ensayo de fluorescencia en las muestras obtenidas cada 12 h en un periodo de 96 h para las cepas HD1 WT, VV, Thur y Thur/ChiA. Como resultado, la actividad enzimática de HD1 Thur/ChiA presenta un incremento directo en la síntesis de quitinasa respecto al tiempo (figura 9), siendo las 96 h el tiempo con mayor actividad enzimática reportado (32.12 mU/mg), a comparación con los controles HD1 WT, VV y Thur (5.06, 7.69 y 6.35, respectivamente). Cabe mencionar que se trata de la única cepa que contiene el gen de la quitinasa por lo que la adición de éste tuvo un efecto positivo en el aumento de la actividad enzimática en el periodo comprendido entre las 48 a 96 h.

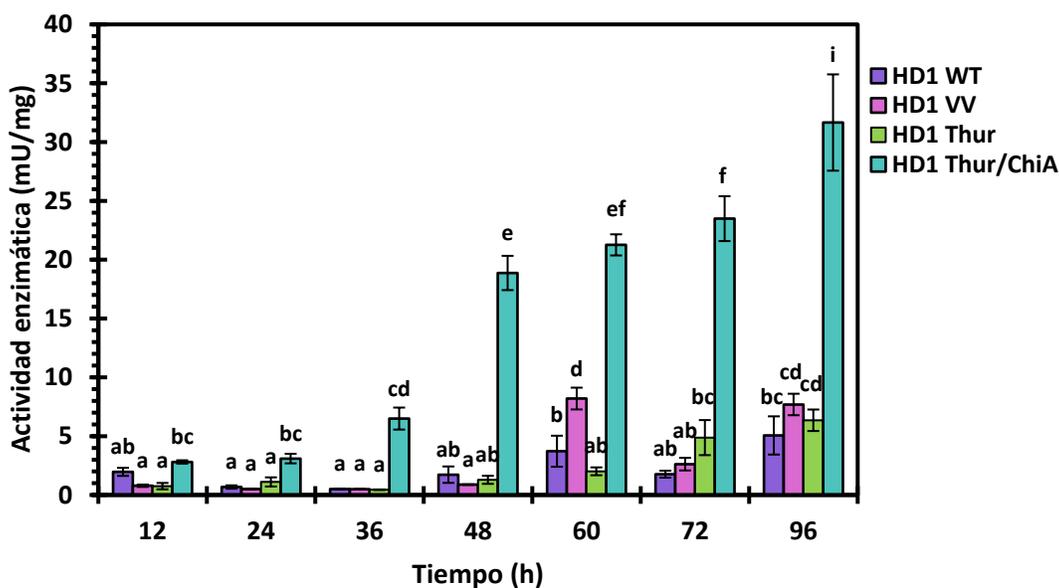


Figura 9. Actividad enzimática de la cepa recombinante HD1/pSTAB-pThur/ChiA74dsp (HD1 Thur/ChiA) y sus respectivos controles (HD1 WT, VV y Thur). Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre cada cepa ($p \leq 0.05$). Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar.

En estudios previos realizados por Barboza-Corona *et al.*, (2009), se demostró que *Bacillus thuringiensis* HD-73 transformada con el gen de ChiA74 bajo

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

la regulación del promotor fuerte pCytA y una secuencia estabilizadora de RNAm 5´(STAB-SD), presenta un rendimiento de quitinasa hasta ~362 veces superior a su parental. En el caso de HD1 Thur/ChiA, se obtuvo un rendimiento de quitinasa de hasta ~6.35 veces superior al de la cepa parental (figura 9).

Considerando las 72 h como el último tiempo de actividad antimicrobiana presentado por HD1 Thur/ChiA, hasta el momento se considera como el tiempo más viable para llevar a cabo la recolección de las tres proteínas a partir de una sola cepa, es decir el tiempo de sincronización deseado, ya que a las 72 h HD1 Thur/ChiA presentó el segundo valor más alto de actividad enzimática registrado para todas las cepas (23.49 mU/mg).

Formación del complejo espora-cristal Cry1A

Las proteínas insecticidas Cry, se encuentran como inclusiones proteicas en la célula y forman parte del complejo espora-cristal presente en la fase de esporulación de Bt. En el monitoreo llevado a cabo durante las 96 h de crecimiento, se pudo apreciar que a partir de las 48 h se comienza a distinguir la espora y cristal en las cepas evaluadas (HD1 WT, VV, Thur y Thur/ChiA), pero es hasta las 60 h cuando se observa con mayor claridad la presencia de estas en los polos de la célula (figura 10). A las 72 h, se observaron las inclusiones proteicas como cristales bipiramidales (Cry1A) y la espora ligeramente ovalada y refringente (figura 10 b, círculo rojo y círculo azul, respectivamente) en HD1 WT, VV y Thur, pero no en HD1 Thur/ChiA (figura 10 k), aquí los cristales presentaron una forma cuboidal o circular y de menor tamaño, además de una menor cantidad de esporas. Fueron pocos los casos en los que se observó un cristal bipiramidal a las 96 h de crecimiento, lo cual se pudo deber a que en este tiempo ya no hay síntesis de thurincina H por lo cual hay menor gasto energético de la célula. A partir de las 96 a 120 h más del 90% de las células ya habían lisado en todas las cepas.

En estudios realizados por Barboza-Corona *et al.* (2014) y González-Ponce *et al.*, (2019) se confirmó que la expresión de la proteína ChiA74 en HD1 tiene una

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

reducción de aproximadamente el 33% en el área de los cristales en cepas recombinantes comparada con los cristales producidos en la cepa parental. Por lo que nuestra transformante pudo haber reducido el tamaño de los cristales y la cantidad de la proteína Cry sintetizada debido a que también expresa la quitinasa ChiA74 y thurincina H.

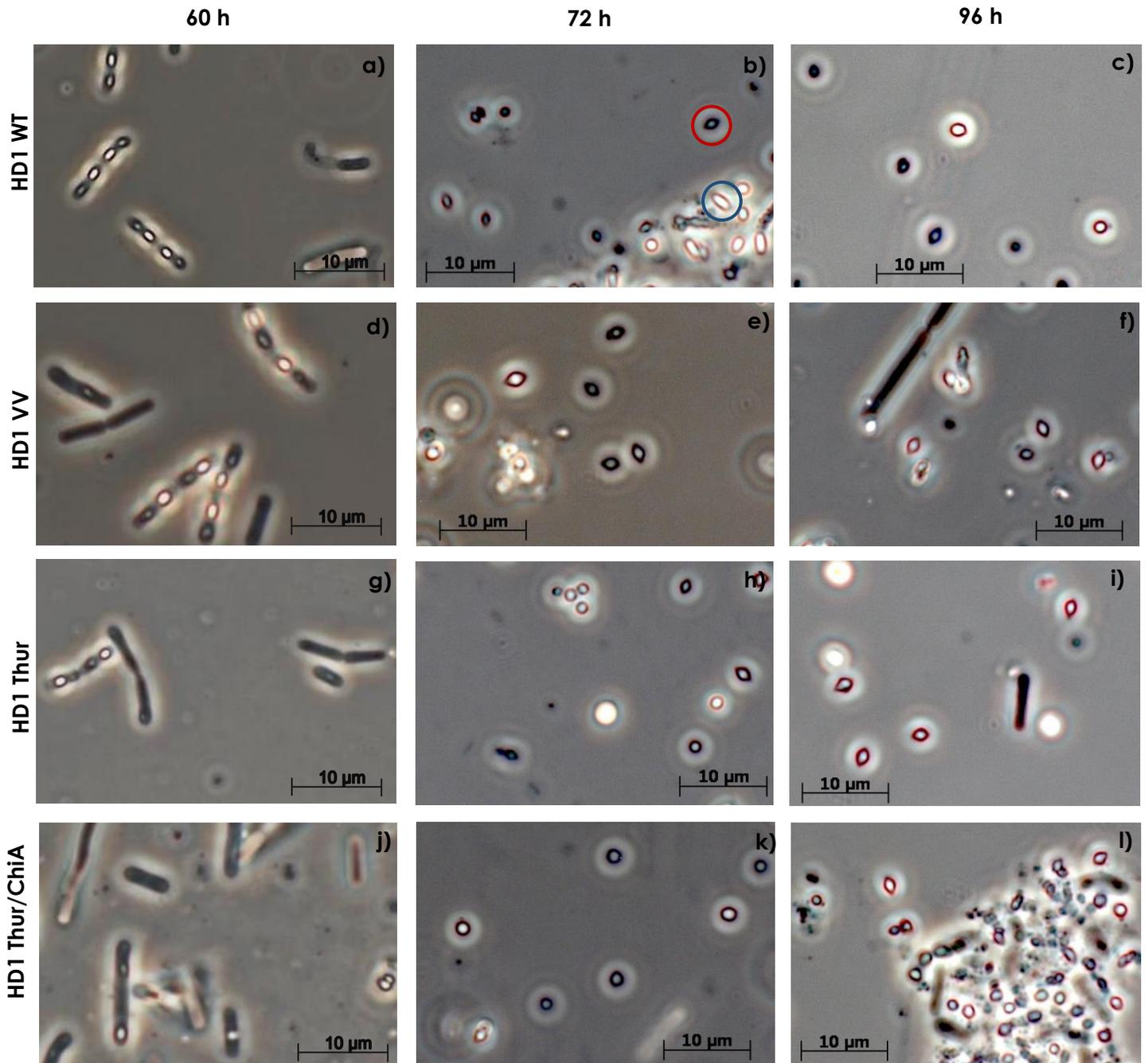


Figura 10. Microscopía por Contraste de Fases (ZEISS AXIO). Formación del complejo espора- cristal a las 60, 72 y 96 horas de crecimiento de la cepa HD1 silvestre y sus transformantes. El círculo rojo muestra un cristal bipiramidal típico de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 constituido por proteínas insecticidas Cry1. El círculo azul muestra una espора que al ser observada por microscopía es refringente.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Posterior a la observación de la formación del complejo espора- cristal, se procedió a corroborar la presencia de proteínas Cry por medio de SDS-PAGE tomando como referencia las muestras recolectadas a las 60, 72, 96 y 120 h (figura 11 a, 11 b, 11 c y 11 d, respectivamente), cuyo perfil proteico esperado eran bandas que oscilan entre los 120-130 kDa y 60 kDa, puesto que los cristales bipiramidales de HD1 están formados por Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac que tienen masas moleculares entre 120-130 kDa; mientras que las inclusiones cuboidales están compuestas de proteínas Cry2A de aproximadamente 60 kDa (Federici, Park, & Bideshi, 2010).

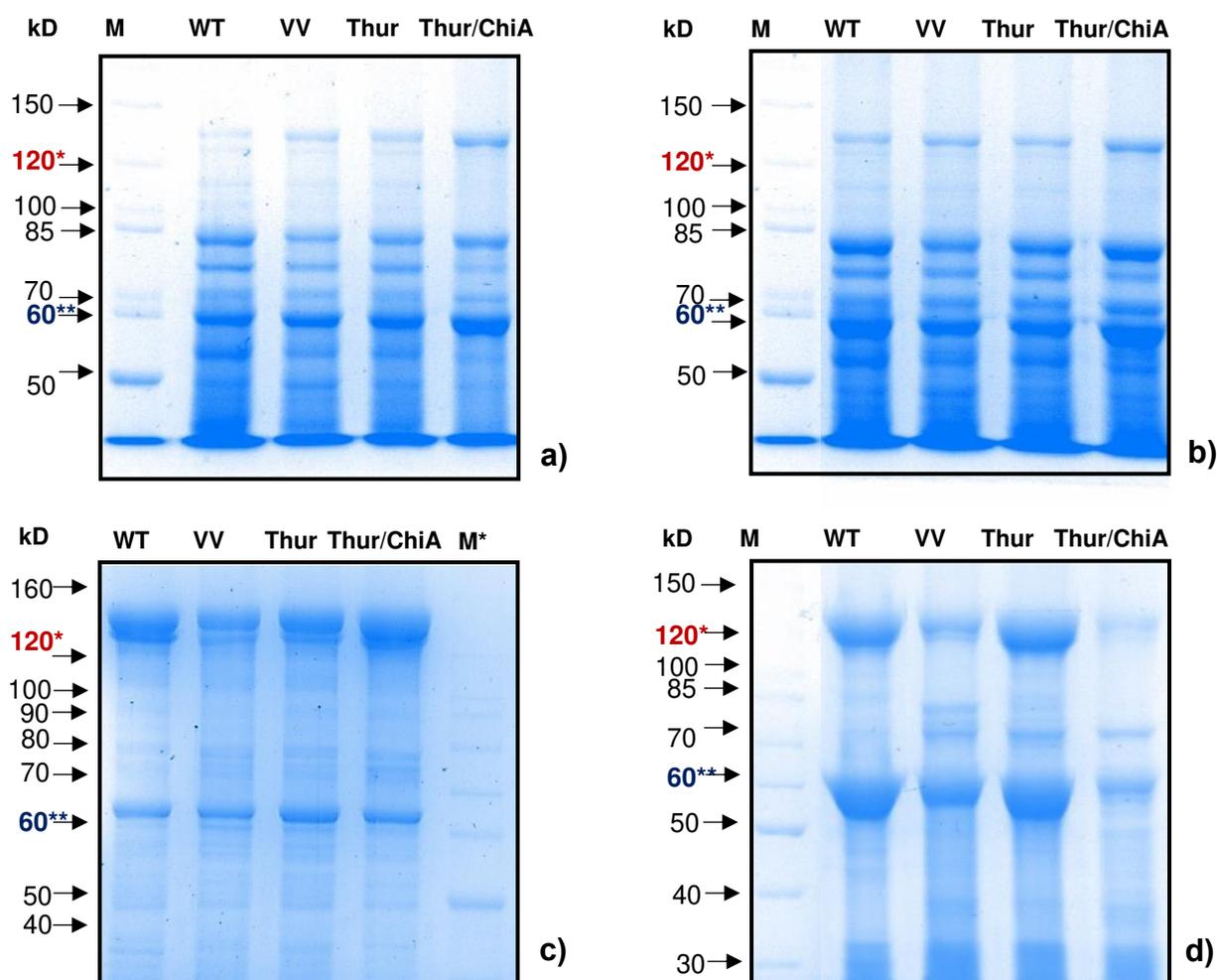


Figura 11. Monitoreo de la producción de proteínas Cry 1Ac, a las 60 (a), 72 (b), 96 (c) y 120 h (d) por SDS-PAGE. **M:** Marcador de peso molecular ThermoFisher Scientific. **M*:** Marcador de peso molecular Bench Mark™ **WT:** HD1 Silvestre. **VV:** HD1/pPG-pHT3101. **Thur:** HD1/pSTAB-pThur. **ThurChiA:** HD1/ pSTAB-pThur/ChiA74Δsp.

* Síntesis de proteínas Cry1A ** Síntesis de proteínas Cry2

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Con ello, se esclareció la presencia de proteínas Cry en HD1 Thur/ChiA, cuyas bandas a las 60 y 72 h resultaron ser más definidas en comparación con las cepas HD1 WT, VV y Thur, lo cual nos permite establecer que la lisis celular se lleva a cabo en fase temprana en nuestra cepa de estudio, lo que puede ser beneficioso para el desarrollo de los productos posteriores y su aplicación en el cultivo, sin embargo podría ser un factor limitante en cuanto a su eficacia como agente bioinsecticida, debido a que los cristales no se desarrollan en su totalidad. A las 96 y 120h hay un aumento drástico en la producción de cristales en HD1 WT y HD1 Thur, mientras que en HD1 TT no hubo un cambio significativo en el tamaño de las bandas (figura 11 d).

Conteo de células viables

Los análisis estadísticos del recuento de esporas muestran que todas las cepas recombinantes de HD1 (VV, Thur y Thur/ChiA) producen menos esporas viables. HD1 Thur/ChiA es la cepa que muestra una menor producción de esporas, se encontró que hay una reducción del 80% respecto a la cepa silvestre (WT) a las 72 y 96 h (tabla 5). Debe considerarse que desde la observación microscópica y recuento en placa la presencia de esporas fue mucho menor en las cepas recombinantes respecto a las observadas en la cepa silvestre (figura 12), lo que ocurre generalmente en cepas recombinantes reguladas por pCyt y STAB, esto se atribuye a la alta producción de toxinas que disminuye la reproducción o capacidad de producir esporas viables (Park, Bideshi, Johnson, & Federici, 1999).

Tabla 6. Recuento medio de esporas viables de la cepa HD1 silvestre y las recombinantes, cultivadas durante tiempos de 72 y 96 h.

CEPA	No. de UFC/mL*	
	72 h	96 h
HD1	5.52 x 10 ⁹ (9.19 x 10 ⁸) ^c	7.94 x 10 ⁹ (6.51 x 10 ⁸) ^d
HD1 pHT3101/pPG	3.61 x 10 ⁹ (7.5 x 10 ⁸) ^b	5.47 x 10 ⁹ (3.72 x 10 ⁸) ^c
HD1 pCyt/pThur	1.7 x 10 ⁹ (4.73 x 10 ⁸) ^a	2.84 x 10 ⁹ (7.21 x 10 ⁸) ^b
HD1 pCyt/pThur-ChiA74dsp	1.03 x 10 ⁹ (3.57 x 10 ⁸) ^a	1.37 x 10 ⁹ (3.16 x 10 ⁸) ^a

* Los valores seguidos de literales diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a P≥0.05. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

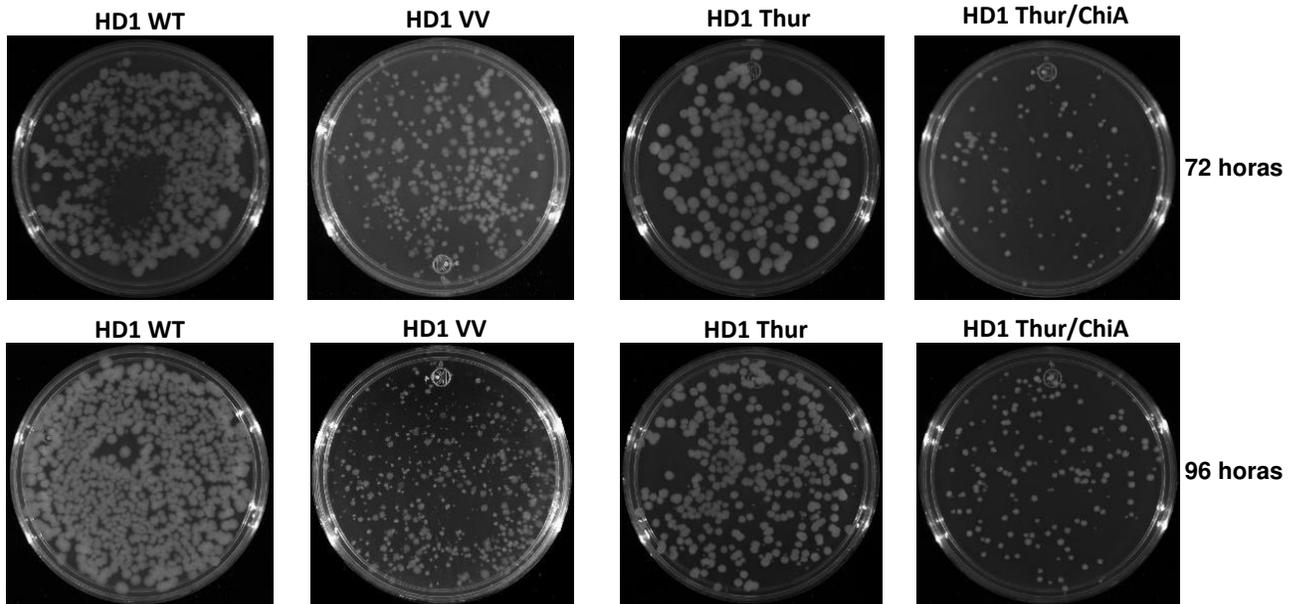


Figura 12. Monitoreo de esporas viables de las cepas HD1 WT, HD1 VV, HD1 Thur y HD1 Thur/ChiA y mediante placas de Petri a las 72 y 96 h.

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante ensayos de actividad antimicrobiana, quitinolítica y de síntesis del complejo espora-cristal, se puede considerar como tiempo de sincronización las 72 h, tiempo en el que se pueden obtener las tres proteínas a partir de la cepa recombinante de HDI pSTAB-pThur/ChiA72dsp (HD1 Thur/ChiA).), es decir, de una sola fuente para futuras aplicaciones.

VII.II. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de thurincina H en maíz

VII.II.I. Purificación de thurincina H

La producción de thurincina H se realizó con la cepa sobreproductora Cry⁻B/pThur una vez obtenida se verificó la actividad antimicrobiana de thurincina H por el método de difusión en pozos y posteriormente se purificó por cromatografía de exclusión molecular. Se recolectaron 70 fracciones recolectadas a las cuales se les realizó un ensayo de actividad para encontrar las fracciones con la thurincina H pura, la fracción 38 mostró efecto inhibitorio, en esa fracción se observó un pico único como se muestra en el cromatograma (figura 14, a). 100 μ L de esta fracción fueron concentradas en un 50% del volumen total y corridas en un gel tris-tricina teñido con plata, en el cual se detectó una banda de aproximadamente 4 kDa, la cual corresponde al peso de thurincina H, al mismo tiempo se realizó actividad en sobrecapa en donde se muestra el efecto inhibitorio correspondiente a la banda de thurincina H.

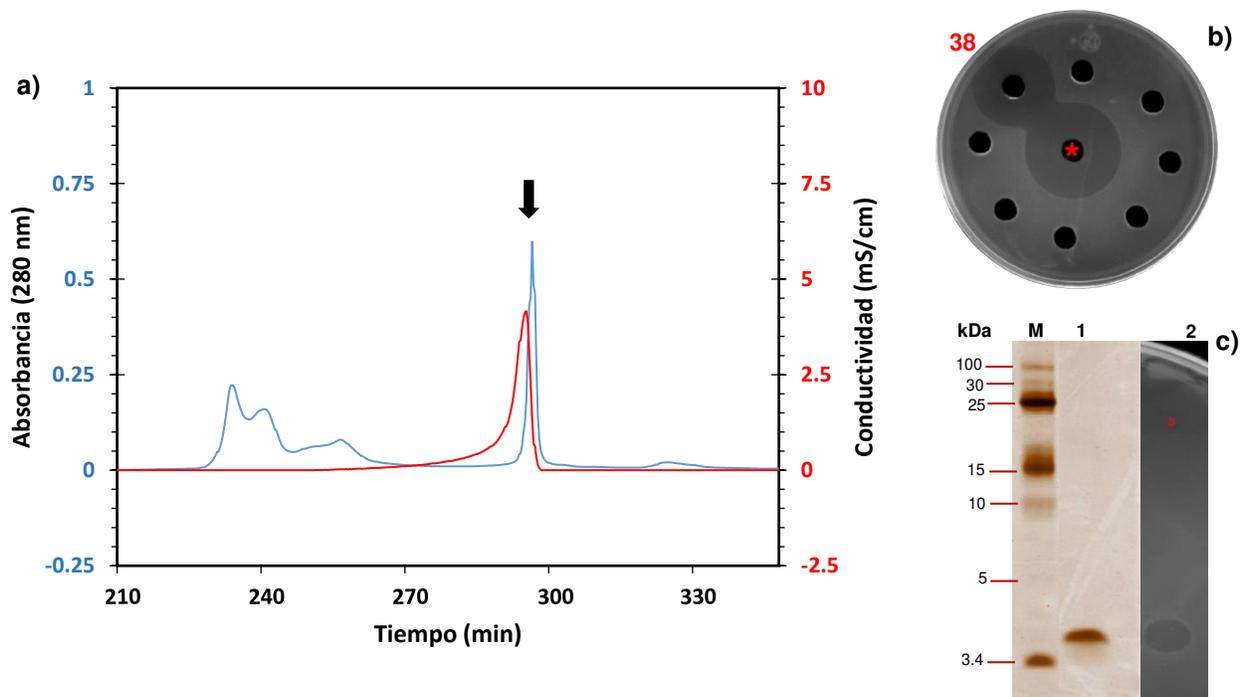


Figura 13. Purificación de thurincina H. **a)** Cromatograma de purificación por cromatografía de exclusión molecular. La flecha negra indica el pico de elución de la actividad antimicrobiana al tiempo \sim 300 min. **b)** Actividad antibacteriana por el método de difusión en pozos utilizando *B. cereus* como cepa indicadora. Las fracciones 37 a 44 fueron analizadas para seleccionar aquellas que contenían la thurincina H, siendo ésta la fracción 38. El extracto crudo de la thurincina H fue utilizado como control positivo (marcado con un asterisco). **c)** Geles tris-tricina. M: marcador de peso molecular; carril 1, thurincina H pura concentrada (Fracción 38) teñida con plata; carril 2, thurincina H pura en sobrecapa utilizando *B. cereus* como cepa indicadora.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

VII.II.II. Producción de extractos crudos

A partir de la evaluación de la actividad antibacteriana de las cepas recombinantes Cry⁻B/pThur, Cry⁻BΔThnA y Cry⁻B silvestre mediante ensayos de pozos, para los tiempos 12, 24 y 36 h, se obtuvo que en los tres tiempos la cepa sobreproductora Cry⁻B/pThur presenta actividad antibacteriana (figura 14 a, pozos marcados con tres asteriscos), mientras que Cry⁻BΔThnA y Cry⁻B silvestre (figura 14 a, pozos marcados con dos y un asterisco, respectivamente) no presenta actividad en ningún tiempo. Posteriormente mediante la tinción con plata de extractos crudos de las tres cepas en geles de poliacrilamida y actividad en sobrecapa, se corroboró la presencia (Cry⁻B/pThur) o ausencia (Cry⁻B silvestre y Cry⁻BΔThnA) de la bacteriocina.

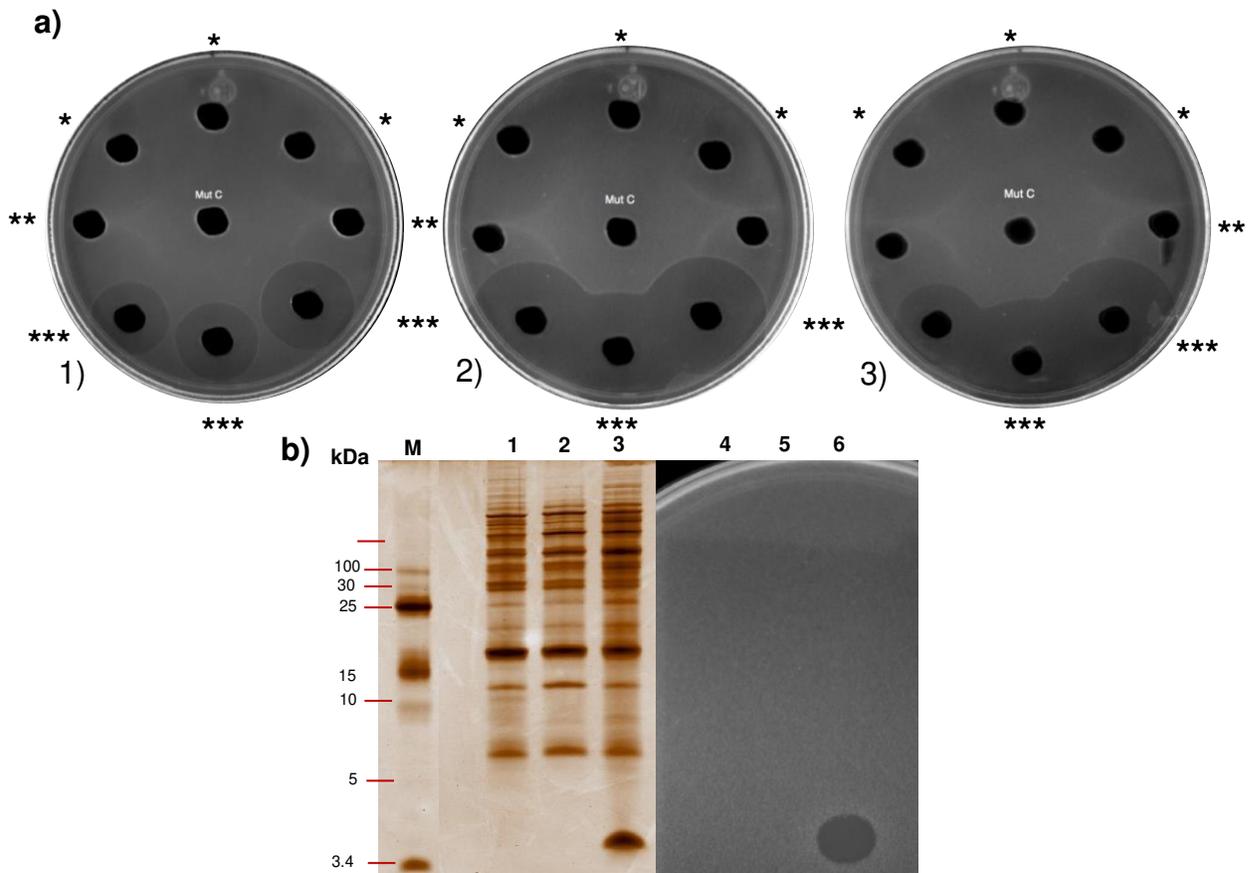


Figura 14. Síntesis y ausencia de thurincina H en extractos crudos de Cry⁻B silvestre y sus recombinantes. **b)** Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en pozos a las 12 (1), 24 (2) y 36 (3) horas de crecimiento, por triplicado. * Cry⁻B silvestre; ** Cry⁻B-ThnA; *** Cry⁻B/pThur. **c)** Geles tris-tricina de extractos crudos tratados para su aplicación en semillas de maíz. **Izquierda**, tinción en plata: M, marcador de peso molecular; 1, Cry⁻B silvestre; 2, Cry⁻B-ThnA; 3, Cry⁻B/pThur. **Derecha**, actividad por sobrecapa: 4, Cry⁻B silvestre; 5, Cry⁻B-ThnA; 6, Cry⁻B/pThur.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Estos resultados aseguran el uso correcto de los extractos crudos en los posteriores ensayos en maíz (figura 14 b) debido a que la cepa silvestre y la mutante no tienen la capacidad de sintetizar thurincina H con lo cual se asegurará si el efecto promotor de crecimiento se debe a la bacteriocina y no a otro compuesto presente en el extracto crudo.

VI.III.VI. Evaluación de la estabilidad de thurincina H

Thurincina H en extracto crudo presentó una actividad antimicrobiana hasta los 43 días bajo condiciones de temperatura ambiente. La bacteriocina inició con una área de inhibición de $\sim 460 \text{ mm}^2$, la cual para el día 43 disminuyó en un 52% ($\sim 218 \text{ mm}^2$). El periodo más estable comenzó a partir del día 3 al 24, ya que del día de inicio al día tres (72 h) hubo un descenso del área de inhibición de $\sim 130 \text{ mm}^2$ que representa hasta más de un 12% en la pérdida de actividad total (figura 15). Comparando con thurincina 17, ésta fue estable cuando se mantuvo a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 días, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 días, a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h, en estos periodos de tiempo, se pudo lograr obtener una actividad del 100% (Gray *et al.*, 2006).

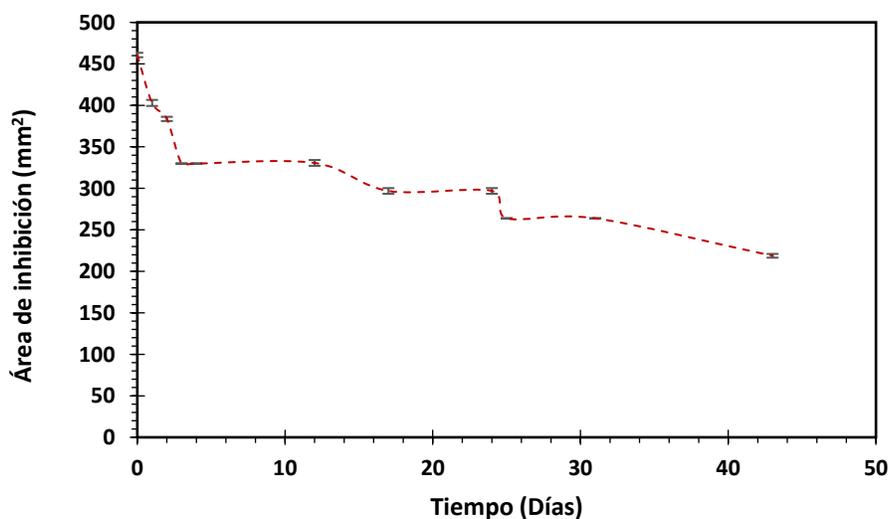


Figura 15. Monitoreo de la actividad antibacteriana de Thurincina H (Extracto crudo) resuspendida en agua, a temperatura ambiente ($28\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Thurincina H, además, no pierde su actividad antibacteriana al ser liofilizada (figura 16). De acuerdo con los resultados obtenidos por el método de difusión en pozos, el área de inhibición fue exactamente la misma antes y después de liofilizado el extracto crudo. Al realizar una dilución 1:2, del extracto liofilizado y control, hubo un ligero decremento del área de inhibición (tabla 6) de la muestra liofilizada (~347 mm²) respecto a la muestra control (~460 mm²).



Figura 16. Efecto del proceso de liofilizado en extracto crudo de Thurincina H. 1: Thurincina sin liofilizar; 2: Thurincina liofilizada.

Tabla 7. Área de inhibición de Thurincina H liofilizada y sin liofilizar.

Muestra	Diámetro del halo de inhibición	
	Sin diluir	Dilución 1:2
Control	610.25 ± 0 mm ²	460.63 ± 24.99 mm ²
Liofilizada	610.25 ± 0 mm ²	347.53 ± 28.32 mm ²

Los resultados de este ensayo muestran que al aplicar thurincina H en los ensayos en maíz en etapa de germinación, la bacteriocina permanece activa puesto que el periodo de germinación se lleva a cabo durante 4 días (96 h) a temperatura de 28° C ±2°C. La estabilidad de thurincina H al proceso de liofilizado es prometedor para futuros ensayos en su aplicación junto a proteínas insecticidas y quitinasas.

VII.II.III. Evaluación de la actividad de thurincina H en extracto crudo sobre la germinación de maíz sometidas a estrés salino (NaCl)

Las semillas de maíz blanco B-937 fueron sometidas a estrés salino y posteriormente se aplicaron diferentes concentraciones de los extractos crudos. Después de 96 horas, tiempo establecido como periodo de germinación, es decir, tiempo en que aparece el hipocótilo, se evaluó el porcentaje de germinación y la longitud radicular. De manera general, se observó un efecto positivo sobre la germinación de las semillas tratadas con thurincina H respecto a los controles: extractos crudos de las cepas no productoras de bacteriocina, buffer de fosfatos 50 mM y agua. Por otra parte, para el control buffer de fosfatos 50 mM se esperaba obtener resultados similares al control agua, sin embargo, tanto el porcentaje de germinación como la longitud radicular disminuyó considerablemente (76.67% y 4.66 cm, respectivamente) por lo que, para ensayos posteriores se sustituyó por agua destilada estéril para resuspender los extractos crudos.

Para las semillas sometidas a estrés salino a una concentración de 50 mM, no se mostró diferencia significativa al aplicar thurincina H para la variable porcentaje de germinación (tabla 7), sin embargo, el tratamiento 3 (80µg/mL) presentó 10% más semillas germinadas (86.67%) respecto al control NaCl 50 mM (76%) y, además, hubo diferencia estadísticamente significativa en la longitud radicular de las semillas tratadas con thurincina H (5.22 cm) comparando con el control NaCl 50 mM (4.51 cm). Cabe mencionar que los mejores resultados se presentaron con el extracto crudo proveniente de Cry⁻B pThur, el cual contiene la bacteriocina, y del control Cry⁻BΔThnA (tabla 7), por lo que no se puede asegurar que el efecto mostrado sea causado por thurincina H ya que Cry⁻B-ThnA cuenta con el clúster genético de la bacteriocina, pero sin los genes estructurales por lo que no tiene la capacidad de sintetizarla.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Tabla 8. Evaluación de la germinación de maíz blanco (B-937 BIOSEMILLAS) bajo condiciones de estrés salino (NaCl 50 mM).

Tratamientos		Porcentaje de Germinación (%)	Longitud radicular (cm)
Controles	H ₂ O	93.3 ± 5.77 ^a	6.53 ± 0.20 ^e
	Buffer	76.67 ± 11.55 ^a	4.66 ± 0.23 ^{bcd}
	NaCl 50 mM	76.67 ± 5.77 ^a	4.51 ± 0.15 ^{abcd}
C1: 222 µg/mL	Cry ⁻ B pThur	73.33 ± 5.77 ^a	3.95 ± 0.21 ^{abc}
	Cry ⁻ B silvestre	66.67 ± 5.77 ^a	3.42 ± 0.25 ^a
	Cry ⁻ BΔThnA	80 ± 0 ^a	4.96 ± 0.26 ^{bcd}
C2: 110 µg/mL	Cry ⁻ B pThur	83.33 ± 11.55 ^a	4.76 ± 0.21 ^{bcd}
	Cry ⁻ B silvestre	76.67 ± 5.77 ^a	4.08 ± 0.16 ^{ab}
	Cry ⁻ BΔThnA	83.33 ± 5.77 ^a	5.25 ± 0.29 ^d
C3: 80 µg/mL	Cry ⁻ B pThur	86.67 ± 11.55 ^a	5.22 ± 0.21 ^c
	Cry ⁻ B silvestre	70 ± 17.32 ^a	4.15 ± 0.19 ^{cd}
	Cry ⁻ BΔThnA	80 ± 0 ^a	5.28 ± 0.32 ^{ec}

Valores promedio (n=30) ± Desviación estándar. Literales deferentes entre cada fila indican diferencia significativa (P ≤ 0.05). Comparación de medias por Tukey.



Figura 17. Longitud del crecimiento radicular en semillas tratadas con thurincina H. **A)** Control 50 mM NaCl. **B)** Concentración 2: Cry⁻BΔThnA. **C)** Concentración 3: Cry⁻B/pThur.

Respecto a las semillas sometidas a estrés salino 100 mM, al aplicar extracto crudo de Cry⁻B/pThur en concentraciones que oscilan entre los 80 y 110 µg/mL, se observó un incremento tanto en porcentaje de germinación como longitud radicular (tabla 8). El porcentaje de germinación más alto se registró en las semillas tratadas con el tratamiento C3 de Cry⁻B/pThur, el cual fue hasta 26% superior al control NaCl 100 mM, incluso 10% superior al porcentaje de germinación presentado en el control buffer de fosfatos 50 mM. Dicho tratamiento también presentó las raíces más largas (4.46 cm).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Tabla 9. Evaluación de la germinación de maíz blanco (B-937 BIOSEMILLAS) bajo condiciones de estrés salino (NaCl 100 mM).

	Tratamientos	Porcentaje de Germinación (%)	Longitud radicular (cm)
Controles	H2O	93.3 ± 5.77 ^b	6.53 ± 0.20 ^e
	Buffer	76.67 ± 11.55 ^{ab}	4.66 ± 0.32 ^{cd}
	NaCl 100 mM	60 ± 10 ^{ab}	3.86 ± 0.18 ^{bc}
C1: 222 µg/mL	Cry ⁻ B pThur	66.66 ± 5.77 ^{ab}	3.71 ± 0.14 ^{abc}
	Cry ⁻ B silvestre	70 ± 0 ^{ab}	2.7 ± 0.7 ^a
	Cry ⁻ BΔThnA	63.33 ± 11.54 ^{ab}	4.05 ± 0.20 ^{cd}
C2: 110 µg/mL	Cry ⁻ B pThur	76.66 ± 11.55 ^{ab}	3.8 ± 0.17 ^{abcd}
	Cry ⁻ B silvestre	56.66 ± 5.77 ^a	2.73 ± 0.15 ^a
	Cry ⁻ BΔThnA	66.66 ± 5.77 ^{ab}	4.46 ± 0.20 ^{cd}
C3: 80 µg/mL	Cry ⁻ B pThur	86.67 ± 5.77 ^{ab}	4.47 ± 0.17 ^{cd}
	Cry ⁻ B silvestre	46.6 ± 5.77 ^a	2.62 ± 0.14 ^a
	Cry ⁻ BΔThnA	60 ± 10 ^{ab}	4.27 ± 0.20 ^{cd}

Valores promedio (n=30) ± Desviación estándar. Literales deferentes entre cada fila indican diferencia significativa (P ≤ 0.05). Comparación de medias por Tukey.

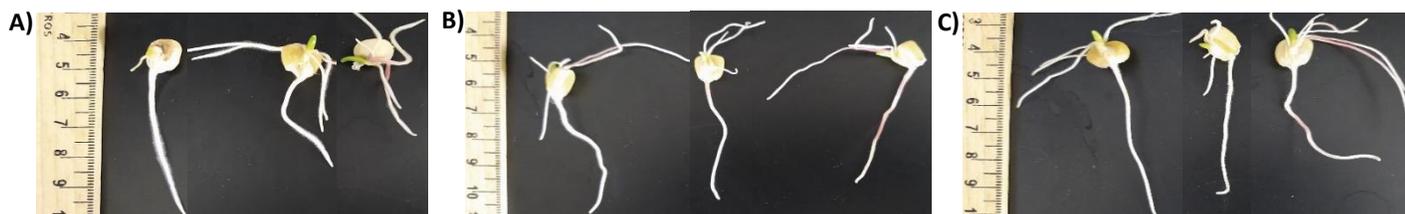


Figura 18. Longitud del crecimiento radicular en semillas tratadas con thurincina H. **A)** Control 100 mM NaCl **B)** Concentración 2: Cry⁻BΔThnA. **C)** Concentración 3: Cry⁻B/pThur.

El estrés salino 200 mM afectó severamente el proceso de germinación de las semillas de maíz blanco, así como el tamaño de la raíz principal, la deformación radicular fue más evidente en todos los tratamientos (figura 17) comparando con las semillas únicamente tratadas con agua. En particular, el porcentaje de germinación más alto únicamente alcanzó el 60% (tabla 9), el cual corresponde a la concentración 80 µg/mL de Cry⁻B/pThur, además la longitud radicular (3.06 cm) fue superior al control NaCl 200 mM (2.32 cm). El porcentaje de germinación y longitud

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

radicular del control Cry⁻BΔThnA a 222 μg/ mL, fue de los valores más altos que se registraron (53.33% y 3.43 cm, respectivamente).

Tabla 10. Evaluación de la germinación de maíz blanco (B-937 BIOSEMILLAS) bajo condiciones de estrés salino (NaCl 200 mM).

	Tratamientos	Porcentaje de Germinación (%)	Longitud radicular (cm)
Controles	H2O	93.3 ± 5.77 ^c	6.53 ± 0.20 ^e
	Buffer	76.67 ± 11.55 ^{bc}	4.66 ± 0.32 ^d
	NaCl 200 mM	40 ± 0 ^{ab}	2.32 ± 0.11 ^{ab}
C1: 222 μg/mL	Cry ⁻ B pThur	36.66 ± 11.54 ^{abc}	1.79 ± 0.13 ^a
	Cry ⁻ B silvestre	30 ± 0 ^a	1.8 ± 0.09 ^a
	Cry ⁻ BΔThnA	53.33 ± 5.77 ^{ab}	3.43 ± 0.25 ^{bc}
C2: 110 μg/mL	Cry ⁻ B pThur	46.66 ± 5.77 ^{ab}	2.75 ± 0.26 ^{abc}
	Cry ⁻ B silvestre	30 ± 5.77 ^a	1.87 ± 0.11 ^a
	Cry ⁻ BΔThnA	33.33 ± 5.77 ^a	2.88 ± 0.22 ^{abc}
C3: 80 μg/mL	Cry ⁻ B pThur	60 ± 10 ^{abc}	3.06 ± 0.16 ^{bc}
	Cry ⁻ B silvestre	26.66 ± 5.77 ^a	1.66 ± 0.33 ^{abc}
	Cry ⁻ BΔThnA	40 ± 10 ^{ab}	2.24 ± 0.20 ^{abc}

Valores promedio (n=30) ± Desviación estándar. Literales deferentes entre cada fila indican diferencia significativa (P ≤ 0.05). Comparación de medias por Tukey.

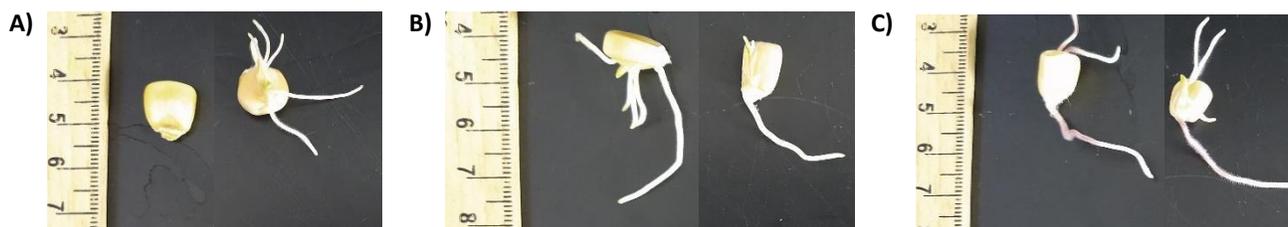


Figura 19. Longitud del crecimiento radicular en semillas tratadas con thurincina H. **A)** Control 200 mM NaCl **B)** Concentración 2: Cry⁻BΔThnA. **C)** Concentración 3: Cry⁻B/pThur.

La concentración 3, que corresponde a 80 μg/ mL del extracto crudo proveniente de Cry⁻B/pThur aplicada en la etapa de germinación en semillas de maíz blanco sometido a estrés salino (NaCl) 50, 100 y 200 mM muestra un efecto

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

positivo, aunque no estadísticamente significativo, por lo cual se consideró como la concentración seleccionada para realizar un ensayo con más replicas. Cabe resaltar que la concentración correspondiente a 80 µg/ mL presentó una actividad antibacteriana ~150 U (figura 20 b).

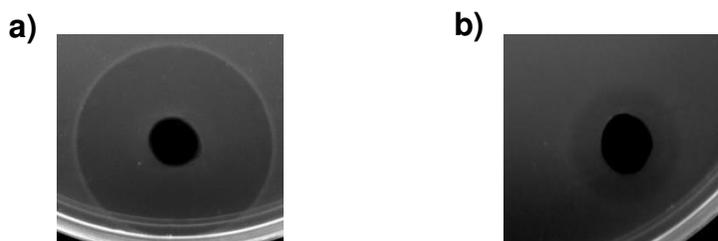


Figura 20. Actividad antibacteriana contra *Bacillus cereus* 183. a) Extracto crudo de thurincina H sin diluir correspondiente al tratamiento 1. b) Actividad antibacteriana de thurincina H del tratamiento 3 (80 µg/mL) que corresponde a la cantidad de thurincina H obtenida en tiempo de sincronización, 72 h.

Los extractos crudos de Cry⁻B/pThur, Cry⁻BΔThnA y Cry⁻B silvestre fueron resuspendidos en agua destilada estéril y ajustados a una concentración final de 80µg/mL de proteína total. Después de su aplicación en 60 semillas de maíz bajo estrés salino 50, 100 y 200 mM, los resultados mostraron que el porcentaje de germinación (tabla 10) más alto corresponde a semillas tratadas con extracto crudo de Cry⁻B/pThur tanto en condiciones salinas 50 mM (88%) como 100 mM (76%). En cuanto al estrés salino 200 mM las semillas tratadas con el extracto crudo de Cry⁻BΔThnA presentaron el mayor porcentaje de germinación (56%), inclusive mayor que las tratadas con el extracto que contiene thurincina H (44%); efecto que puede deberse al estrés generado por la alta concentración salina lo cual ocasiona variaciones en la germinación y crecimiento de plántulas dentro de un mismo genotipo (Galeshi, Soltani, & Zeinali, 2001).

Semillas de maíz sometidas a estrés salino y tratadas con thurincina H en extracto crudo, mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) en la longitud de la raíz principal en comparación con su control salino (50, 100 y 200 mM). Para la longitud radicular de semillas estresadas a una concentración salina 50 mM, la longitud radicular fue de ~7 cm, mientras que para los extractos crudos control fue de ~6.3 cm (Cry⁻B silvestre) y ~6.5 cm (Cry⁻BΔThnA), los resultados

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

indicaron una mejora en el tamaño de la raíz principal puesto que para el control NaCl 50 mM apenas se alcanzó un promedio de ~6.1 cm (figura 21).

Tabla 11. Porcentaje de germinación. Aplicación del tratamiento 3 en maíz blanco B-930 durante la etapa de germinación.

Tratamientos	H2O	NaCl	Cry ⁻ B pThur	Cry ⁻ B silvestre	Cry ⁻ B ΔThnA
NaCl 50 mM	*92 ± 2.36 ^c	84 ± 2.36 ^b	88 ± 2.36 ^{bc}	70 ± 2.36 ^a	72 ± 2.36 ^a
NaCl 100 mM	*92 ± 2.36 ^c	68 ± 2.44 ^a	76 ± 2.44 ^b	66 ± 2.44 ^a	70 ± 2.44 ^{ab}
NaCl 200 mM	*92 ± 2.36 ^d	36 ± 2.36 ^a	44 ± 2.36 ^b	34 ± 2.36 ^a	56 ± 2.36 ^c

Valores promedio (n=60) ± Desviación estándar. Literales diferentes entre cada fila indican diferencia significativa (P ≤ 0.05). Comparación de medias por Tukey (P≤0.05).

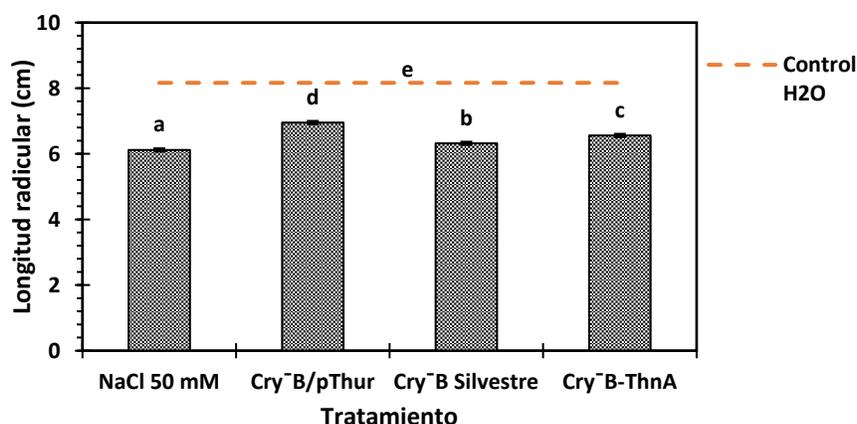


Figura 21. Efecto de la aplicación del tratamiento 3 (80 µg/mL) en semillas de maíz sometidas a estrés salino (NaCl 50 mM). Literales diferentes indican diferencia significativa (P≤0.05).

Para las semillas estresadas con NaCl 100 mM (figura 22), en promedio, la longitud radicular de las semillas tratadas con extracto crudo de Cry⁻B/pThur fue de ~6 cm, lo cual indica una diferencia estadísticamente significativa (P≤0.05) comparando con los controles NaCl 100 mM (~5.64 cm), Cry⁻B silvestre (~5.61 cm) y Cry⁻BΔThnA (~5.6 cm).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

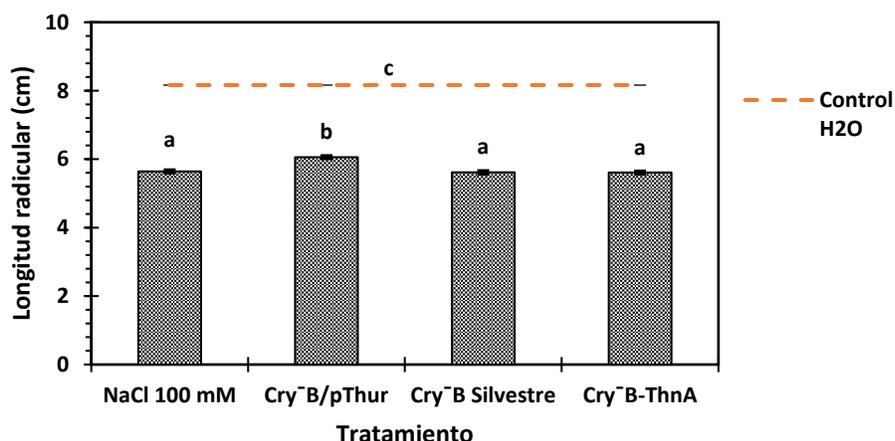


Figura 22. Efecto de la aplicación del tratamiento 3 (80 µg/mL) en semillas de maíz sometidas a estrés salino (NaCl 100 mM). Literales diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

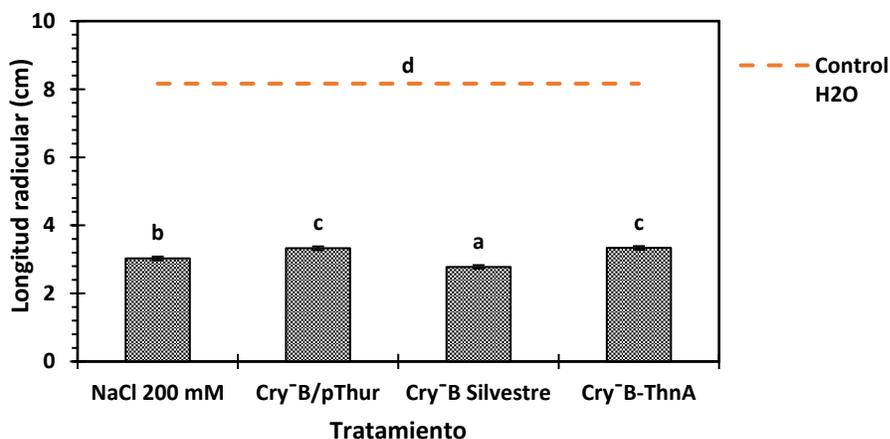


Figura 23. Efecto de la aplicación del tratamiento 3 (80 µg/mL) en semillas de maíz sometidas a estrés salino (NaCl 200 mM). Literales diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

Por otra parte, el tratamiento de Cry⁻B/pThur en semillas sometidas a estrés salino 200 mM al igual que el tratamiento de Cry⁻BΔThnA, no presentan diferencia estadísticamente significativa entre ellos (figura 23) al evaluar la variable de longitud radicular (~3.3 cm para ambos), pero si respecto a los controles NaCl 200 mM (~3 cm) y Cry⁻B silvestre (~2.8 cm).

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

En estudios en donde se evaluó el efecto de Thurincina 17, homóloga a Thurincina H en semillas de soja estresadas con diferentes grados de salinidad, Thurincina 17 logró aliviar la inhibición de la germinación por estrés salino hasta una concentración de 150 NaCl mM, con la mejor respuesta observada a NaCl 100 mM (Subramanian, Ricci, Souleimanov, & Smith, 2016). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en el presente estudio, en la evaluación de la germinación de maíz, cuya mejor respuesta se observó en una concentración de NaCl 100 mM.

El uso de extracto crudo en una concentración de 80 µg/mL y con una actividad antibacteriana de 150 U, resulta prometedor para la aplicación en maíz durante la etapa de germinación, ya que provee un ligero aumento en el porcentaje de semillas germinadas y en la longitud de la radícula, la cual es de gran importancia para el desarrollo posterior de raíces radicales secundarias y pelos absorbentes. En monocotiledóneas como el maíz, la importancia de la radícula recae en el desarrollo de las primeras hojas de la planta por lo cual, el haber obtenido longitudes radiculares mayores al aplicar thurincina H muestra una ventaja competitiva para el buen desarrollo de la planta (INTAGRI, 2017).

VII.II.IV. Efecto promotor de crecimiento de thurincina H pura y en extracto crudo.

Los tratamientos Thur 5×10^{-9} M y T3 (80 µg/mL), tuvieron un efecto estadísticamente significativo tanto en el porcentaje de germinación como en la longitud radicular respecto al control H₂O. En cuanto al tratamiento E.C. 5×10^{-9} M no se presentó diferencia estadísticamente significativa (tabla 11, figura 24).

El porcentaje de germinación fue hasta 7% superior al porcentaje presentado en el control (tabla 10) al aplicar los tratamientos Thur 5×10^{-9} M y T3, mientras que el porcentaje de germinación del tratamiento E.C. 5×10^{-9} M fue inferior en un 9% comparado con el control. El valor promedio de la longitud radicular del

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

tratamiento T3 fue de ~6.68 cm, cuyo dato registrado fue el más alto, seguido del correspondiente al tratamiento Thur 5x10⁻⁹ M de ~6.38 cm. Valores que comparados con el control agua son superiores por casi 1 cm en los primeros cuatro días de iniciar la germinación.

Tabla 12. Porcentaje de germinación de maíz blanco (B-937 BIOSEMILLAS).

Tratamientos	Control H2O	Thur 5x10 ⁻⁹ M*	E.C.5x10 ⁻⁹ M**	T3***
% de Germinación	85 ± 2.10 ^b	92 ± 2.10 ^c	76 ± 2.10 ^a	92 ± 2.10 ^c

Valores promedio (n=100) ± Desviación estándar. Literales diferentes entre cada fila indican diferencia significativa (P ≤ 0.05). Comparación de medias por Tukey. *Thurincina H pura. ** Thurincina en extracto crudo. *** Tratamiento 3: 80 µg/mL de extracto crudo de Cry^B/pThur.

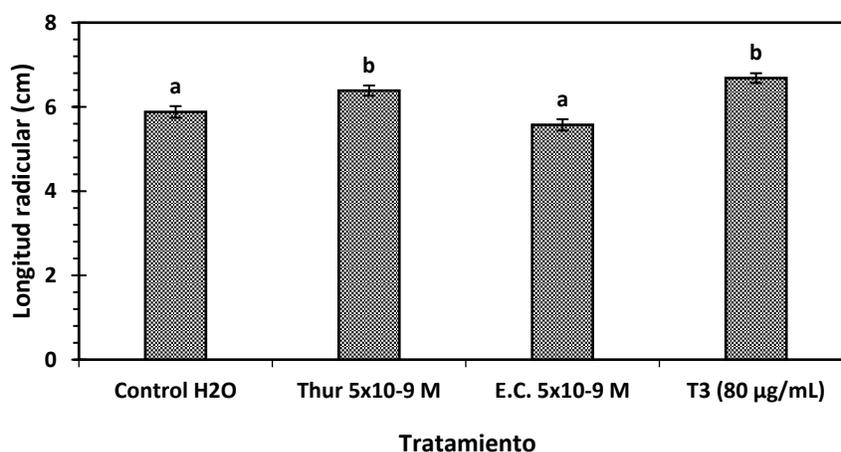


Figura 24. Comparación del efecto de thurincina H en diferentes grados de pureza durante la etapa de germinación de maíz blanco (B-937 BIOSEMILLAS). Valores promedio (n=100) ± Error estándar. Literales diferentes indican diferencia significativa (P ≤ 0.05). Comparación de medias por Tukey.

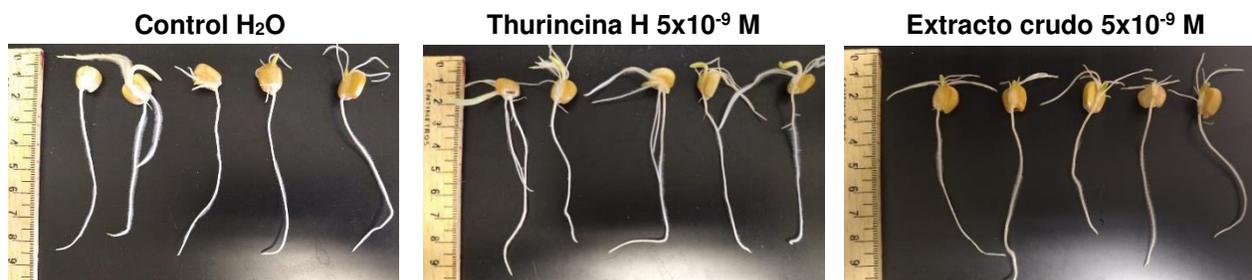


Figura 25. Longitud del crecimiento radicular en semillas tratadas con thurincina H con diferentes grados de pureza.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

En resultados previos, al utilizar thurincina H en extracto crudo de una cepa sobreproductora de la bacteriocina hubo un aumento en el porcentaje de germinación y en longitud radicular, sin embargo también pudo observarse éste efecto en algunos extractos control que no contenían la bacteriocina, por lo cual, para demostrar que el efecto promotor de crecimiento en maíz se debía a thurincina H, se evaluaron diferentes concentraciones de extracto crudo proveniente de cepas no productoras de la bacteriocina (Cry⁻B Silvestre y Cry⁻BΔThnA), en combinación con una concentración 5 x 10⁻⁹ M de thurincina H, durante la etapa de germinación de maíz. Como resultado, todos los tratamientos que contenían la bacteriocina presentaron mayor porcentaje de germinación (tabla 13) y longitud de la radícula (figura 26 y 27) con respecto a su control, inclusive el control de thurincina H pura 5x10⁻⁹ M, presentó mejores resultados en comparación con el control agua.

Tabla 13. Porcentaje de germinación de maíz blanco (B-937 BIOSEMILLAS).

Tratamiento	Proteína Total		40 µg/mL		80 µg/mL		120 µg/mL		160 µg/mL	
	Control H2O	Control Thur	Control E.C.	Thur 5x10 ⁻⁹ M	Control E.C.	Thur 5x10 ⁻⁹ M	Control E.C.	Thur 5x10 ⁻⁹ M	Control E.C.	Thur 5x10 ⁻⁹ M
Cry⁻B silvestre	90 ± 0 ^b	100 ± 0 ^b	95 ± 0 ^b	95 ± 14 ^b	75 ± 14 ^a	100 ± 0 ^b	92.5 ± 7 ^b	95 ± 0 ^b	95 ± 14 ^b	92.5 ± 7 ^b
Cry⁻B ΔThnA	90 ± 0 ^{ab}	100 ± 0 ^b	85 ± 14 ^{ab}	95 ± 0 ^{ab}	92.5 ± 7 ^{ab}	95 ± 0 ^{ab}	85 ± 0 ^{ab}	82.5 ± 7 ^a	85 ± 14 ^{ab}	95 ± 14 ^{ab}

Valores promedio (n=60) ± Desviación estándar. Literales deferentes entre cada fila indican diferencia significativa (P ≤ 0.05). Comparación de medias por Tukey. Control E.C.: Extracto crudo sin thurincina H. Thur: Thurincina H pura.

Considerando las diferentes concentraciones de proteína total del extracto crudo de Cry⁻B Silvestre, el porcentaje de germinación en promedio, osciló entre el 92.5 al 95%, teniendo una germinación hasta del 100% en semillas tratadas con extracto crudo 80 µg/mL más thurincina H 5x10⁻⁹ M, tratamiento con el que se obtuvieron raíces de ~5.26 cm de longitud, mientras que con la aplicación de extracto crudo a la misma concentración sin bacteriocina, la longitud radicular no alcanzó los 5 cm (~4.98 cm). Por otra parte, al aplicar una concentración correspondiente a 160 µg/mL, la longitud radicular alcanzó la mayor longitud

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

radicular, es decir ~5.62 cm, siendo aproximadamente 13% superior a la longitud radicular promedio con su respectivo control (~4.87 cm).

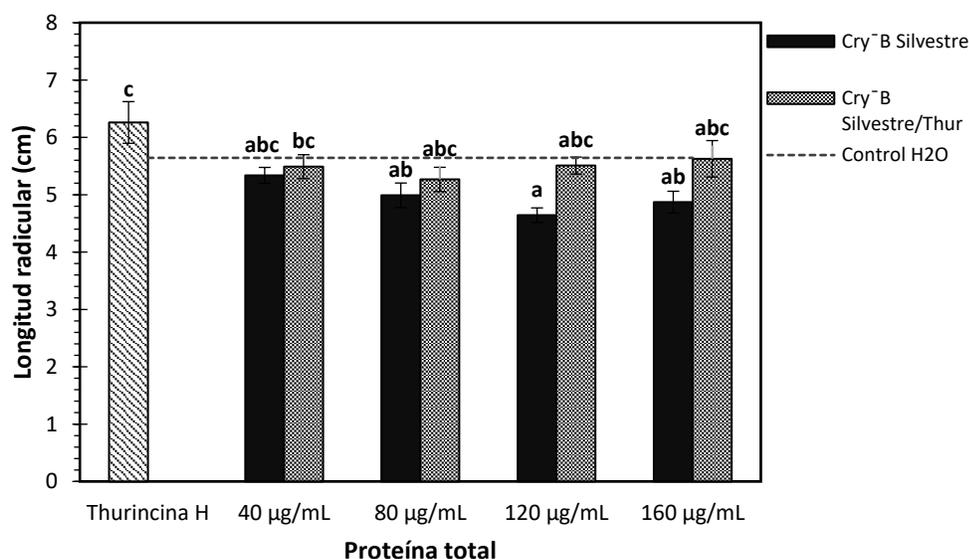


Figura 26. Comprobación del efecto promotor de crecimiento de thurincina H (B-937 BIOSEMILLAS) en extracto crudo de Cry⁻B Silvestre. Valores promedio (n=60) ± Error estándar. Literales deferentes indican diferencia significativa (P≤0.05). Comparación de medias por Tukey.

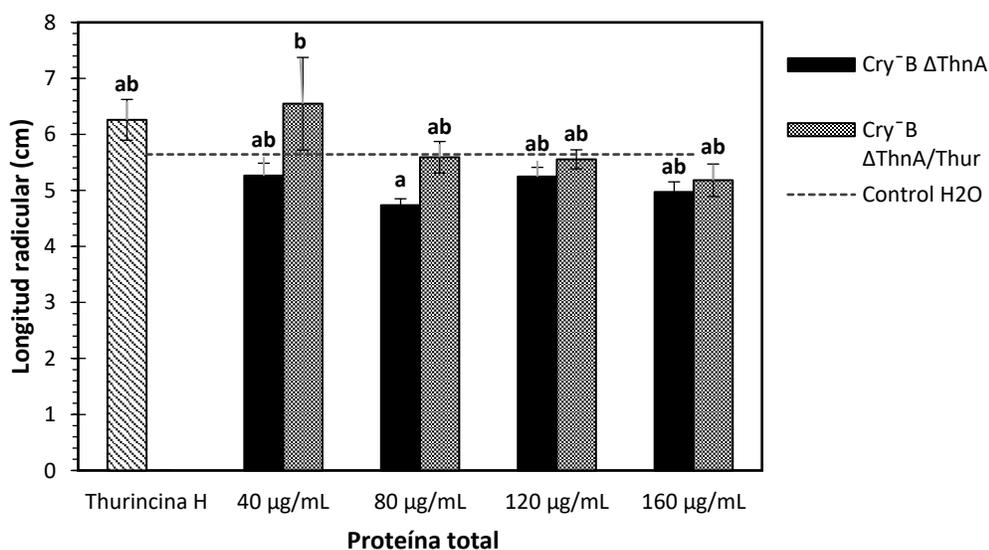


Figura 27. Comprobación del efecto promotor de crecimiento de thurincina H (B-937 BIOSEMILLAS) en extracto crudo de Cry⁻BΔThnA. Valores promedio (n=60) ± Error estándar. Literales deferentes indican diferencia significativa (P≤0.05). Comparación de medias por Tukey.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Por otra parte, aplicar extracto crudo de Cry⁻BΔThnA a una concentración de 40 μg/mL en combinación con thurincina H pura 5x10⁻⁹ M, propició la germinación de maíz hasta en un 95%, siendo 5% superior respecto a su control (extracto crudo sin bacteriocina). Con este tratamiento se obtuvo una longitud radicular promedio de ~6.54 cm, la cual es 21% superior a su control (figura 27), inclusive superando la longitud radicular promedio de los controles Agua y thurincina H pura 5x10⁻⁹ M (5.64 y 6.26 cm, respectivamente), por lo que se considera que el efecto promotor de crecimiento es debido a la bacteriocina.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la evaluación de thurincina H como promotor de crecimiento vegetal, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Tukey (P≤0.05), al aplicar thurincina H pura y en extracto crudo. Por lo cual, es viable la aplicación de la bacteriocina en ambos grados de pureza durante la etapa de germinación de maíz. Sin embargo, la cantidad a aplicar difiere bastante, ya que de manera pura el uso de cantidades nanomolares (5x10⁻⁹ M) son suficientes para observar un efecto, tal y como se mostró en investigaciones previas al aplicar bacteriocinas en forma asperjada en hojas de maíz o bien en forma de riego en la raíz (Lee *et al.*, 2009), mientras que en extracto crudo la concentración óptima fue de 80 μg/mL, es decir una concentración teórica de thurincina H en el orden milimolar (25.84 mM). Aunque la cantidad necesaria de extracto crudo para observar un efecto positivo en la longitud de la radícula de maíz es mucho mayor a comparación de la pura, cabe resaltar que éste únicamente pasa por membranas de corte de 0.22 μm para evitar contaminación microbiana, no así para la muestra purificada, puesto que previamente debe de ser fraccionada por membranas de corte de 30, 10 y 3 kDa, seguido de purificación por columna de exclusión molecular y nuevamente filtrada por membranas de 0.22 μm para evitar contaminación.

Los efectos positivos se ven reflejados con mayor contraste en semillas que fueron germinadas en condiciones estresantes, en nuestro caso estrés salino con NaCl 50 y 100 mM. Subramanian & Smith (2015), sugieren el proteoma de rosetas

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

de *Arabidopsis thaliana* se altera por la señal bacteriana generada por la aplicación en concentraciones nanomolares de thurincina 17, y más aún bajo estrés salino, impartiendo así un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas. Por otra parte, la aplicación de thurincina 17 en condiciones de estrés hídrico, para plantas de soja de 1 mes aumentaron la biomasa vegetal en un 17%, biomasa de raíces en un 37% y biomasa de nódulos de raíces en un 55%, además del aumento de ácido abscísico en las raíces de soja en un 30% (Prudent *et al.*, 2014).

Si bien, el mecanismo de acción que puede dar este efecto en el desarrollo de algunas plantas no está bien dilucidado, se ha propuesto que la forma indirecta de promoción del crecimiento vegetal está relacionada con la acción antagónica de las bacteriocinas frente a bacterias que pueden ser patógenas para la planta, o bien, contra bacterias que se encuentran en el mismo nicho ecológico de aquellas bacterias que tienen una relación positiva con la planta, por ejemplo, rizobacterias fijadoras de nitrógeno (Choudhary & Bhavdish, 2009). Por otra parte, se puede considerar un mecanismo de acción de manera indirecta, que involucra a las moléculas de bacteriocina como una señal de pseudo-estrés lo que genera una cascada de respuestas hormonales en la planta. Además, el uso de estas tecnologías promotoras del crecimiento podría ayudar vigorizar elementos de la microflora del suelo nativo y crear sinergias entre ellos, promoviendo el potencial para disminuir el uso de insumos químicos en la tierra cultivable, y tal vez mejorar productividad de cultivos en suelos salinizados (Azizoglu, 2019; Subramanian & Smith, 2015).

Por el momento, la evaluación de thurincina H como promotor de crecimiento vegetal únicamente se llevó a cabo durante la etapa de germinación, la cual es un evento importante en el inicio de la vida de una planta, los resultados son prometedores para una posterior evaluación de su efecto durante la etapa vegetativa del maíz, por ejemplo.

VIII. CONCLUSIONES

La cepa de *Bacillus thuringiensis* **HD1/pSTAB-pThur/ChiA74Δsp** (HD1 TT) tiene la capacidad de sintetizar thurincina H a las 72 h, así como quitinasa ChiA74 y cristales insecticidas, los cuales no presentan una forma bipiramidal definida sino tipo cuboidal en su mayoría. La cantidad de esporas viables es hasta 5 veces menor en HD1 TT respecto a su parental HD1 WT en el tiempo de sincronización. Este resultado es prometedor puesto que a partir de una sola cepa y en un solo tiempo se colecta el complejo espора-cristal; además, presenta actividad quitinolítica y antibacteriana.

Por otra parte, el estudio de la estabilidad de thurincina H en extracto crudo no es afectada por el proceso de liofilizado. Thurincina H en extracto crudo, mantenida a temperatura ambiente ($28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) y resuspendida en agua destilada, tiene actividad antibacteriana por un periodo de hasta 43 días. Por lo que, la aplicación de la bacteriocina pura en concentraciones nanomolares ($5 \times 10^{-9}\text{ M}$) y en extracto crudo ($80\mu\text{g/mL}$) durante la etapa de germinación de maíz blanco B-933 (Biosemillas) tiene un efecto positivo en el porcentaje de germinación y longitud radicular.

Como perspectivas futuras, **HD1/pSTAB-pThur/ChiA74Δsp** es una cepa que puede ser utilizada para generar proteínas Cry1Ac, ChiA74, thurincina H, que, en conjunto pueden ser aplicadas de manera liofilizada en cultivos de maíz para evaluar el efecto insecticida contra *S. frugiperda* y como promotor de crecimiento vegetal.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

BIBLIOGRAFÍA

- Agaisse, H., & Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal Bacteriology*, *107*, 6027-6032.
- Agaisse, H., & Lereclus, D. (1996). STAB-SD: a Shine–Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Molecular microbiology*, *20*(3), 633-643.
- Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios. (23 de agosto de 2018). *Maíz grano cultivado representativo de México*. Obtenido de Gobierno de México: www.goob.mx/aserca
- Álvarez, A. (1991). Reseña histórica y aspectos bioecológicos del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). . *In Memorias Seminario Spodoptera frugiperda (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos*. Zuluaga, J. L. Muñoz, G., (págs. 12-14). Calí, Colombia.
- Andrews, K. L. (1988). Latin America research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomology*, *71*(4), 630 – 653.
- Ángulo, J. (2012). *Manejo del gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas*. Obtenido de <http://www.turipana.org>
- Arendt, E. K., & Emanuele, Z. (2013). *Cereal grains for the food and beverage industries*. Cambridge: Elsevier.
- Azizoglu, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a Biofertilizer and Biostimulator: a Mini-Review of the Little-Known Plant Growth-Promoting Properties of Bt. *Current Microbiology*, *76*, 1379–1385.
- Badii, M. H., Tejada, L. O., Flores, A. E., López, C. E., & Quiróz, H. (2000). Historia, fundamentos e importancia. (págs. 3-17). Monterrey: UANL.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

- Barboza Corona, J. E., Delgadillo Ángeles, J. L., Castañeda Ramírez, J. E., Barboza Pérez, U. E., Casados Vázquez, L. E., Bideshi, D. K., & del Rincón Castro, M. C. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 as a factory to synthesize alkalilabile ChiA74 Δ sp chitinase inclusions, Cry crystals and spores for applied use. *Microbial Cell Factors*, 13(1), 15.
- Barboza-Corona, J. E., Nieto Mazzocco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernández, R., Bautista, M., Jiménez, M., & Ibarra, J. E. (2003). Cloning, Sequencing, and Expression of the Chitinase Gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1023-1029.
- Barboza-Corona, J. E., Ortiz-Rodríguez, T., de la Fuente-Salcido, N., Bideshi, D. K., Ibarra, J. E., & Salcedo-Hernández, R. (2009). Hyperproduction of chitinase influences crystal toxin synthesis and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(1), 31-42.
- Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D. K., & Salcedo-Hernández, R. (2007). Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of microbiology*, 187(2), 117.
- Baum, J., & Malvar, T. (1995). Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 18, 1-12.
- Blanco, C. A. (2014). Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *Journal of Integrated Pest Management*, 5(4), E1-E9.
- Boyer, C. D., & Shannon, J. C. (1983). The use of endosperm genes for sweet corn improvement. *Plant breeding reviews*, 139-161.
- Bravo, A., Gill, S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423-435.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

- Carlton, B. C., & González-JR, J. M. (1985). The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. *The molecular biology of the bacilli*, 211-249.
- Casados-Vázquez, L. E., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2017). The thnR gene is a negative transcription regulator of the thurincin H genetic cassette in *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*. *Archives of microbiology*, 199(2), 385-390. doi:10.100/s00203-016-1298-1
- Chandler, J., Nardmann, J., & Werr., W. (2008). Plant development revolves around axes. *Trends Plant Science*, 13, 78-84.
- Chen, X. J., Lee, M. K., & Dean, D. H. (1993). Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 9041-9045.
- Choudhary, D., & Bhavdish, N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants-UIT special reference to induced systemic resistance (ISR);-51. *Microbiological Research*(164), 493-513.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. (Octubre de 2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews Microbiology*, 3(10), 777-786.
- Cotter, P., Ross, R., & Hill, C. (2013). Bacteriocins a viable alternative to antibiotics? *Natural Review Microbiol*, 11(2), 95-105.
- Crickmore, N., Zeigler, D., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3), 775-806.
- de Guglielmo, Z. M., & R.F., D. S. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 119-128.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

- de Maagd, R., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review Genetic*, 37, 409-433.
- Didelot, X., Barker, M., Falush, D., & Priest, F. G. (2009). Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Systematic Applied Microbiology*, 32, 81–90.
- Earle, F. (1977). Proteína y aceite en el maíz: variación por años de cultivo de 1907 a 1972.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117-126.
- Estrada, A. J. (2002). *Pastos y Forrajes para el trópico colombiano*. Manizales, Colombia: Universidad De Caldas.
- Federici, B., Park, H., & Bideshi, D. (2010). The basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *Open Toxinology Journal*, 10, 83-100.
- Fideicomiso de Riesgo Comercial FIRCO. (13 de Septiembre de 2017). *El maíz, base de la dieta mexicana desde época prehispánica*. Obtenido de Gobierno de México.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura FIRA. (Diciembre de 2019). *Panorama Agroalimentario*. Obtenido de Dirección de Investigación y Evaluación Económica Sectorial: <https://www.inforural.com.mx>
- Galeshi, S., Soltani, A., & Zeinali, E. (2001). Germination, seed reserve utilization and seedling growth of chickpea as affected by salinity and seed size. *Seed Symposium (26th Congress of the International Seed Testing Association (ISTA))* (pág. 12). Francia: ISTA.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

- Glatron, M. F., & Rapoport, G. (s.f.). Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. *Biochimie*, 54(10), 1291-1301.
- González, J. J. & Carlton, B. (1980). Correlation between specific plasmids and 8-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 5, 351-365.
- Gray, E., Lee, K., Souleimanov, A., Di Falco, M., Zhou, X., Ly, A., Smith, D. (2006). A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), 545-554.
- Grupo Consultor de Mercados Agrícolas (GMCA). (Marzo de 2020). *Comercio Exterior de Granos y Oleaginosas*. Obtenido de <https://gcma.com.mx>
- Hallauer, A. (2000). *Granos especiales*. Boca Ratón: Prensa CRC.
- Hoballah, M., Degen, T., Bergvinson, D., Savidan, A., Tamó, C., & Turlings, T. (2004). Occurrence and direct control potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical lowlands of México. *Agricultural and Forest Entomology*(6), 83-88.
- Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(2), 242-255.
- Ibarra, J. E., & Federici, B. A. (1987). An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 3(2), 187-192.
- INTAGRI. (2017). ¿Sistema Radical o Sistema Radicular? *Artículos Técnicos de INTAGRI*(34), 2.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

- Juarez, B., & Harrison, T. (3 de Diciembre de 2019). Mexico Grain and Feed Annual. Modest Growth Expected for Grain Production and Imports. *Global Agriculture Information Network*.
- Juárez-Hernández, E. O., Casados-Vázquez, L., Brieba, L., Torres-Larios, A., Jiménez-Sandoval, P., & Barboza-Corona, J. (2015). *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis producing endochitinase ChiA74 Δ sp inclusion and its improved activity against *Aedes aegypti*. *Journal Applied Microbiology*, 119(6), 1692–1699.
- Juárez-Hernández, E., Casados-Vázquez, L., Brieba, L., Torres-Larios, A., Jimenez-Sandoval, P., & Barboza-Corona, J. (2019). The crystal structure of the chitinase ChiA74 of *Bacillus thuringiensis* has a multidomain assembly. *Science Reporter*, 9(1), 1-10. doi:10.1038 / s41598-019-39464-z
- Juárez-Hernández, S. O., Casados-Vázquez, L. E., Bideshi, B. K., Salcedo-Hernández, R., & Barboza-Corona, J. E. (2017). Role of the C-terminal and chitin insertion domains on enzymatic activity of endochitinase ChiA74 of *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 52-59.
- Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol*, 39-86.
- Lacey, L. A., & al., e. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J. Invertebr. Pathol.*(132), 1-41.
- Lee, K. D., Gray, E. J., Mabood, F., Jung, W. J., Charles, T., Clark, S. R., & Smith, D. L. (2009). The class IId bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. *Planta*, 229(4), 747-755.
- Lezaun, J. (2016). *Oruga militar o Gusano cogollero un problema para los cultivos de maíz y sorgo*. Obtenido de Croplife Latino América: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/gusano-cogollero>

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

- Lipa, J. (2003). Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. En P. Caballero, & J. Ferré, *Bioinsecticides: Fundamentals and Applications of Bacillus thuringiensis in Integrated Pest Control* (págs. 1-3). Valencia: Universidad Publica de Navarra, PHYTOMA-España.
- López-Bucio, J., A., C.-R., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion Plant Biology*, 6, 280-287.
- Murúa, G., & Virla, E. (2004). Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lep. noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucuman (Argentina). *Acta Zoológica Mexicana*, 20(1), 199-210.
- Murúa, G., Juárez, M., Prieto, S., Gastaminza, G., & Willink, E. (2009). Distribución temporal y espacial de poblaciones larvarias de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) en diferentes hospederos en provincias del norte de la Argentina. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 86(1), 25-36.
- Murúa, G., Vera, M., Abraham, S., Juárez, M., Prieto, S. H., & Willing, E. (2008). Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, 101(3), 639-649.
- Nagpure, A., Choudhary, B., & Gupta, R. K. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Crit. Rev. Biotechnol*(34), 215–232.
- Nardmann, J., & Werr, W. (2009). Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. En J. Bennetzen, & S. Hake, *Handbook of maize: It's biology* (págs. 105-119). New York: Springer.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (22 de Diciembre de 2020). *FAOSTAT*. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *Residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos*. Obtenido de <http://www.fao.org>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). *Gusano Cogollero del Maíz*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <http://www.fao.org>

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (2003). Documento de consenso sobre la biología de *Zea mays* subsp. *mays* (maíz). *Serie sobre la armonización de la supervisión reglamentaria en biotecnología (ENV / JM / MONO (2003), 11(27), 11-15.*

Pacheco-Cano, R. D., De la Fuente-Salcido, N. M., Salcedo-Hernández, R., León-Galván, M. F., Bideshi, D. K., Hernández-Guzmán, G., & Barboza-Corona, J. E. (2014). Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthicin 524: A bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Microbiological research*, *169*(12), 948-953.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*(6), 3296–3325.

Park, H. W., Bideshi, D. K., Johnson, J. J., & Federici, B. A. (1999). Differential enhancement of Cry2A versus Cry11A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of the cry3A STAB mRNA sequence. *FEMS microbiology letters*, *181*(2), 319-327.

Park, H.-W., Delécluse, A., & Federic, B.-A. (2001). Construction and Characterization of a Recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

- Strain That Produces Cry11B. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(1), 37-44.
- Parsons, D. P. (2008). *Maíz* (Tercera ed.). México: Trillas.
- Pastrana, J., & Hernandez, J. (1979). Clave de orugas de lepidópteros que atacan al maíz en cultivo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (INTA)*, 79(1), 13-45.
- Portela-Dussán, D. D., Chaparro-Giraldo, A., & López-Pazos, S. A. (2013). a biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova*, 11(20), 87-96.
- Rezende, M. A., & Cruz, I. D. (1994). Consumo foliar de milho e desenvolvimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) parasitadas por *Chelonus insularis* (Cresson). *Ann. Soc. Entomol. Brasil*, 23(3), 473-478.
- Sánchez, P., Nicholaides, J., & Couto, W. (1977). Physical and chemical constraints to food production in the tropics. En *Chemistry and world food supplies: the new frontiers* (pág. CHEMRAWN II). Los Baños: G. Bixler & L.W. Shenilt eds.
- Saucedo-Acosta, C., Quintana-Quiroz, J., LugoGarcía, G., Saucedo-Acosta, R. H., Borbón-Gracia, A., Sanchez-Soto, B. H., & Casillas-Alvarez, P. (2015). Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidóptera: *Noctuidae*) en maíz de primavera, en Guasave, Sinaloa. *Entomología Mexicana*, 2, 404-410.
- Sauka, D. (2007). Estudio de genes y proteínas insecticidas de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Aportes al conocimiento de su distribución y toxicidad en plagas agrícolas. UBA. Director: Benintende G.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van-Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., . Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology*, 62, 775-806.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

Services, D. o. (2019). Programa de vigilancia de exposición a pesticidas en Texas.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (30 de Septiembre de 2019). *Avance de Siembras y Cosechas. Resumen nacional por cultivo*. Obtenido de Gobierno de México: <http://infosiap.siap.gob.mx>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2014). *Programa de trabajo de la campaña de manejo fitosanitario del maíz, a operar con recursos del componente de sanidad e inocuidad agroalimentaria 2014, el el estado de Queretaro*. Obtenido de <https://www.gob.mx>

Sheridan, W., & Clark, J. (1994). Fertilization and embryogeny in maize. En M. Freeling, & V. Walbot, *The maize handbook (M. Freeling, V. Walbot, Eds)*. (págs. 1-10). New York: Springer.

Singh, R., & Ghildyal, B. (1980). Soil submergence effects on nutrient uptake, growth, and yield of five corn cultivars. *Agronomy Journal*, 737-741.

Sit, C. S., van Belkum, M. J., McKay, R. T., Worobo, R. W., & Vederas, J. C. (2011). The 3D Solution Structure of Thurincin H, a Bacteriocin with Four Sulfur to a-Carbon Crosslinks. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(37), 8718-8721.

Soberón, M., & Bravo, A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*, 14, 303-314.

Soto, J., & Iannacone, J. (2008). Efecto de dietas artificiales en la biología de adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Zoológica Mexicana*(24), 1-22.

Subramanian, S., & Smith, D. L. (2015). Bacteriocins from the rhizosphere microbiome from an agriculture perspective. *Frontiers in plant science*, 6, 909.

“Sincronización de la producción de proteínas Cry1A, ChiA74dsp y Thurincina H en *Bacillus thuringiensis*”

- Subramanian, S., Ricci, E., Souleimanov, A., & Smith, D. L. (2016). A Proteomic Approach to LipoChitooligosaccharide and Thuricin 17 Effects on Soybean Germination Unstressed and Salt. *PloS one*, *11*(8), 1-19.
- Torregrosa, F. (1997). Esquema de mejoramiento de maíz en la Sierra Ecuatoriana. *INIAP*, 8.
- Urretabizkaya, N. (2018). Manejo Integrado de plagas asociadas al cultivo de maíz. Estrategias de control. *Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora*, 22-24.
- Valverde, L., De toledo, Z. A., & Popich, S. (1995). Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Zoológica Lilloana*, *43*, págs. 131-143.
- Wang, G., Feng, G., Snyder, A., Manns, D., Churey, J., & Worobo, R. (2014). Bactericidal thurincin H causes unique morphological changes in *Bacillus cereus* F4552 without affecting membrane permeability. *FEMS Microbiol. Lett.*, *1*(357), 69-76.
- Watson, J. (2008). Diversidad genética del maíz morado. En: Maíz morado: Purple corn. *Carhuapoma-Yance, M. y LópezGuerra, S. (eds)*, 47-51.
- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, *6*(9), 2732-2770.
- Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, L. I., Hui, L. I., & Chun, L. I. (2011). Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *19*(1), 128-134.
- Yáñez López, R., Vázquez Ortega, A., Arreguín Centeno, J. H., Soria Ruíz, J., & Quijano Carranza, J. Á. (2019). Sistema de alerta contra el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *2*(10), 405-416.