

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

## CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

ACTIVIDAD ENDÓFITA DE LA CEPA Y<sub>15</sub> DE *Bacillus thuringiensis* EN CAÑA DE AZÚCAR Y MAÍZ, Y SU EFECTO SOBRE *Spodoptera frugiperda*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

**ANA VERONICA HERNANDEZ CERVANTES**

DIRECTOR DE TESIS: IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO

CO-DIRECTOR: GUADALUPE PEÑA CHORA

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2018

Gracias al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

## **DEDICATORIAS**

A Dios, porque su amor es infinito y eterna su misericordia. Mi compañero en todo momento, mi refugio en tormentas, mi padre celestial.

A mis padres, Herminia Cervantes y Eduardo Hernández, cada uno de mis logros sea pequeño o grande, son de ustedes también.

A mis hermanos, Wendy, Laura y Eduardo.

A Pepe, Camila y Scarlett.

A Elizabeth Cuevas Reyes.

A Darío Escamilla Gonzales.

A Ernestino Cervantes, sembraste amor y dejaste huella en muchos corazones. Gracias, por tanto.

## **Agradecimientos**

A Dios, porque en todo momento estuvo conmigo, porque nada sería sin él.

A la Dra. Irene Perea, por permitirme formar parte de su laboratorio y apoyarme en todo momento, sobre todo en las situaciones más complicadas del proyecto. Sus consejos los llevo guardados en mi corazón.

Al Dr. Guadalupe Peña, por sus consejos, comentarios y correcciones, y sobre todo por brindarme su amistad y su apoyo.

Al Dr. Víctor Hernández, gracias por todo su apoyo y consejos, sobre todo en los momentos difíciles.

Al Dr. José de Jesús Arellano, por su paciencia y apoyo en el transcurso de este proyecto, también por sus correcciones y comentarios para este trabajo.

Al Dr. Iván Arenas, por sus correcciones y aportaciones para este trabajo.

Al Dr. Jorge Ibarra, por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme muchas enseñanzas. Gracias por brindarme su apoyo en todo momento.

A mis padres, porque su amor y apoyo es incondicional. Porque no me dejan sola y me han sacado adelante a pesar de todo.

A mis hermanos, su amor y apoyo nunca faltó. Gracias por las risas, los regaños, las bromas, los juegos, su protección y su cuidado.

A mis amigos del laboratorio de control biológico, Edwin, Feme (Jorge Enrique), Thalís, Ivette y Víctor, ustedes alegraron mis días.

A Sandra Cuate, por toda la ayuda que me brindaste para este proyecto, por esas tardes de bromas y risas, y sobre todo por tu amistad, eres una lindura, hiciste mis días en el laboratorio mucho más amenos, gracias por todo.

A mis amigos de Botánica Estructural, por su apoyo, amistad, y por todos esos buenos momentos que compartimos, muchas gracias.

A Karina y Marel, unas maravillosas personas y excelentes amigas que me acompañaron en esta etapa de mi vida, ustedes hicieron los días menos pesados y llevaderos, gracias por su amistad, apoyo, compañía, ayuda, consejos, por todas esas tardes llenas de diversión, por sus palabras de consuelo cuando era necesario, y sobre todo por todos esos momentos llenos de risas que hasta el estómago nos dolía. Las quiero mucho, son las mejores compañeras de laboratorio que alguien puede tener.

A Dunstand, porque me aconsejaste, ayudaste y acompañaste en esta etapa de mi vida, por tu amistad y cariño, muchas gracias, eres un amigo excepcional.

A Rosalina, por tu paciencia y ayuda, también por brindarme tu amistad, y dejarme tantas enseñanzas, fue un placer conocerte, y una agradable experiencia trabajar contigo, te llevo en mi corazón.

A la Mtra. Laura Lina, por su paciencia, compañía y amistad, por darme su apoyo en todo momento y por todos los lindos ratos que compartimos juntas. También por todo lo que aprendí de ti, eres una persona con un gran corazón, lleno de bondad y nobleza.

A Darío, sin duda alguna eres una maravillosa persona que ocupa un lugar especial en mi corazón, y agradezco tu cariño, tus atenciones, y todo lo que haces por mí. Gracias por estar a mi lado y permitirme formar parte de tu vida, por todas las alegrías que me regalas día con día, por motivarme a mejorar, y sobre todo, por permitirme compartir mi felicidad y amor contigo.

A Jatniel, porque tu sincera amistad nunca faltó, por esas tardes llenas de risas y bromas, y sobre todo por tu apoyo.

Por último, pero no por eso menos importante, a mi mejor amiga, Elizabeth Cuevas, gracias por tu apoyo incondicional, por tantas y tantas risas, por ser mi confidente, por ayudarme en todo momento, por todos esos días llenos de tonterías, por tu cariño y por tu sincera amistad, tienes un corazón lleno de amor y bondad. Eres la mejor, nunca lo olvides.

"El único hombre que no se equivoca es el que nunca hace nada"

— Johann W. Goethe

# INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	3
3.1. Género <i>Spodoptera</i> Guenee, 1852.....	3
3.1.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	3
3.1.2. Clasificación taxonómica.....	3
3.1.3. Origen y distribución geográfica.....	4
2.2. Control biológico.....	6
2.2.1. Generalidades de <i>B. thuringiensis</i> .....	7
2.2. Microorganismos endófitos.....	10
2.2.1. Colonización de endófitos bacterianos.....	11
2.2.2. Función de los microorganismos endófitos.....	11
2.2.3. Microorganismos endófitos como promotores de crecimiento.....	12
2.2.4. Microorganismos endófitos como agentes de control biológico.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. HIPOTESIS.....	14
5. OBJETIVO GENERAL.....	14
5.1. Objetivos específicos.....	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1. Estrategia metodológica.....	15
6.2. Material biológico.....	16
6.2.1. Material vegetal.....	16
6.2.2. Insectos.....	16
6.2.3. Cepa bacteriana y plásmido.....	17
6.2.4. Transformación de <i>B. thuringiensis</i> con el plásmido pMutin-GFP <sup>+</sup> .....	18
6.2.5. Extracción de DNA plasmídico.....	19
6.2.6. Establecimiento de plántulas de maíz en condiciones controladas.....	20
6.2.7. Evaluación de la actividad endófito de <i>B. thuringiensis</i> en plántulas de maíz en condiciones controladas.....	21
6.3. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en maíz en condiciones de invernadero.....	22

6.3.1.	Evaluación de la actividad entomopatógena de <i>B. thuringiensis</i> en plántulas de maíz sobre <i>S. frugiperda</i> en condiciones controladas.....	23
6.3.2.	Evaluación de la actividad entomopatógena de <i>B. thuringiensis</i> en hojas de maíz .....	24
6.3.3.	Establecimiento del cultivo de caña de azúcar bajo condiciones de invernadero.....	25
6.3.4.	Evaluación de la actividad endófito de <i>B. thuringiensis</i> en caña de azúcar en condiciones de invernadero .....	25
6.3.5.	Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en caña de azúcar en condiciones de invernadero .....	26
6.3.6.	Evaluación de la actividad entomopatógena de <i>B. thuringiensis</i> en hojas de caña de azúcar.....	27
6.3.7.	Análisis estadísticos .....	27
7.	RESULTADOS .....	28
7.1.	Transformación de <i>B. thuringiensis</i> con el plásmido pMutin-GFP <sup>+</sup> .....	28
7.2.	Evaluación de la actividad endófito de <i>B. thuringiensis</i> en plántulas de maíz bajo condiciones controladas.....	29
7.1.1.	Evaluación de la actividad entomopatógena de <i>B. thuringiensis</i> cepa Y15 en plantas de maíz en condiciones controladas.....	34
7.2.1.	Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en maíz en condiciones de invernadero .....	34
7.2.2.	Evaluación de la actividad entomopatógena de <i>B. thuringiensis</i> en hojas de maíz.....	36
7.1.2.	Evaluación de la actividad endófito de <i>B. thuringiensis</i> en caña de azúcar en condiciones de invernadero .....	37
7.1.3.	Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en caña de azúcar en condiciones de invernadero .....	40
7.1.4.	Evaluación de la actividad entomopatógena de <i>B. thuringiensis</i> en hojas de caña de azúcar.....	43
8.	DISCUSIÓN .....	43
9.	CONCLUSIONES.....	47
10.	PERSPECTIVAS.....	48
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	48
12.	APENDICES .....	54



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estrategia experimental .....	16
Figura 2. Mapa del vector pMUTIN-GFP+ .....	18
Figura 3. Células de cepa Y15 de <i>B. thuringiensis</i> en microscopio de fluorescencia a 100x .....	28
Figura 4. Electroforesis del plásmido pMutin-GFP+ en gel de agarosa al 0.8%. .....	29
Figura 5. Reaislamiento de la cepa Y15::GFP en medio LB con antibiótico. ....	30
Figura 6. Perfil proteico (SDS-PAGE 12%) de bacterias aisladas de las plantas de maíz inoculadas con la cepa Y15::GFP de <i>B. thuringiensis</i> . ....	31
Figura 7. Micrografía confocal (Olympus FV1000, lente 60x) de la cepa Y15::GFP en un corte longitudinal de peciolo de maíz. ....	32
Figura 8. Micrografía confocal (Olympus FV1000, lente 60x) de la cepa Y15::GFP en un corte transversal de tallo de maíz. ....	33
Figura 9. Micrografía confocal (Olympus FV1000, lente 60x) de la cepa Y15::GFP en un corte transversal de raíz de plantas de maíz. ....	33
Figura 10. Micrografía confocal (Olympus FV1000, lente 60x) en un corte transversal de tallo de plantas de maíz de un tratamiento control, donde no se inocularon bacterias. ....	34
Figura 11. Grafica de Altura de plantas de maíz. ....	35
Figura 12. Gráfica del peso seco de plantas de maíz. ....	36
Figura 13. Mortalidad de <i>S. frugiperda</i> al día 7 post tratamiento con la cepa Y-15::GFP. ....	37
Figura 14. Aislamiento de la cepa Y15 endófitas. ....	38
Figura 15. Perfil proteico de bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de plantas inoculadas con la cepa Y15 (SDS-PAGE 10%). ....	39
Figura 16. Porcentaje de reaislamiento de <i>B. thuringiensis</i> durante 6 semanas en caña de azúcar. ....	40
Figura 17. Efecto de <i>B. thuringiensis</i> en la altura de las plantas de caña de azúcar. ....	41
Figura 18. Gráfica de barras de los promedios de las medias $\pm$ SD del peso seco de las plantas inoculadas con $1 \times 10^7$ células de en agua o tween sobre el follaje o sustrato. ....	42
Figura 19. Mortalidad de <i>S. frugiperda</i> al día 7 post tratamiento con la cepa Y-15::GFP. ....	43

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos para la evaluación de la actividad endófito de <i>B. thuringiensis</i> cepa Y15::GFP en plantas de maíz.....	21
<b>Cuadro 2.</b> Tratamientos para la evaluación de la actividad promotora de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en maíz en condiciones de invernadero.....	23
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos para la evaluación de la actividad entomopatógena de <i>B. thuringiensis</i> en hojas de maíz.....	25
<b>Cuadro 4.</b> Tratamientos para la evaluación de la actividad endófito de <i>B. thuringiensis</i> en caña de azúcar en condiciones de invernadero.....	26
<b>Cuadro 5.</b> Tratamientos para la evaluación de la actividad entomopatógena de <i>B. thuringiensis</i> en hojas de caña de azúcar.....	27



## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio en plantas de maíz y caña de azúcar en condiciones de laboratorio e invernadero para evaluar la actividad endófito, entomopatógena y promotora de crecimiento de la cepa Y15 de *Bacillus thuringiensis*. Para facilitar la identificación de la bacteria endófito en los tejidos de la planta se empleo la proteína GFP. Se realizó la transformación de *B. thuringiensis* cepa Y15 con el plásmido pMutin-GFP. El análisis histológico permitió observar la bacteria localizada en el interior de los tejidos de tallos y hojas de plántulas de maíz. La actividad endófito de la cepa Y15 se confirmó al comparar los perfiles proteicos de las cepas reaisladas de tejidos inoculados de maíz y caña de azúcar. En condiciones de invernadero la bacteria fue detectada como endófito hasta 60 días post inoculación en caña de azúcar.

La evaluación de la eficiencia de la cepa Y15 entomopatógena sobre *Spodopera frugiperda* se llevo a cabo mediante ensayos en condiciones de laboratorio empleando plántulas de caña de azúcar y maíz, el valor máximo de mortalidad (40%) fue observado en larvas alimentadas con hojas de plantas de maíz crecidas en sustrato inoculado con la bacteria ( $1 \times 10^8$  células/ml), en caña de azúcar se alcanzó un valor de 30% de mortalidad.

Se hicieron bioensayos de promoción de crecimiento con la cepa Y15 de *B. thuringiensis*, los datos muestran que la bacteria es promotora de crecimiento dependiendo del modo de aplicación.

Los resultados de este estudio contribuyen a comprender la actividad entomopatógenos, endófito y promotora del crecimiento de la cepa Y15 de *B. thuringiensis*. Sin embargo, es necesario realizar estudios en condiciones de campo que permitan validar el uso de esta cepa como alternativa para el control y manejo de los insectos plaga de maíz y caña de azúcar.

## 2. INTRODUCCIÓN

En México, la producción de caña de azúcar y maíz, es de gran importancia socioeconómica, ya que tiene una amplia demanda en el ámbito doméstico e industrial. A partir estos dos cultivos se obtienen diferentes subproductos como azúcar, papel, aceites, etc. Además, son parte de los cinco productos básicos de consumo para la población mexicana junto con el frijol, trigo y café (COFUPRO, 2013). La producción de ambos cultivos se ve afectada por el ataque de diversas plagas que provocan la reducción del rendimiento y aumentan los costos de producción.

Algunas de las estrategias prometedoras para el control de plagas es el uso de microorganismos endófitos (Perez *et al.* 2013; Sánchez *et al.* 2013).

El término “endófito” es usado para referirse a microorganismos que habitan dentro de los tejidos de la planta, (Sikora *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2008). Los microorganismos endófitos comprenden especialmente hongos y bacterias que colonizan tejidos internos de la planta sin causar daños, teniendo una relación simbiótica-mutualista (Petrini, 1991; Escolástico, 2013). Existen bacterias y hongos entomopatógenos que se emplea para el control de plagas, tal es el caso de *Bacillus thuringiensis* (Bt), una bacteria utilizada en el control biológico de insectos plaga, principalmente para el orden Lepidóptera (Hernández, 2015), la cual también esta reportada con actividad endófito. Monnerat y colaboradores (2009), encontraron *B. thuringiensis* en forma natural dentro de plantas de algodón y demostraron la capacidad de *B. thuringiensis* de colonizar las plantas como un endófito y presentar patogenicidad sobre *Trichoplusia ni* y *Spodoptera frugiperda*. García *et al.*, 2017 reporta la actividad endófito de *B. thuringiensis* en *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris*, así como capacidad de la bacteria de traslocarse a diferentes tejidos y seguir siendo patógena a *Trichoplusia ni*. En el presente trabajo se busca demostrar la actividad endófito de *B. thuringiensis* en caña de azúcar y maíz con el fin de evaluar si la bacteria tiene la capacidad de traslocarse en los tejidos de la planta y

también proporcionarle algún beneficio a la planta, como promoción de crecimiento y actividad entomopatógena sobre *S. frugiperda*.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. Género *Spodoptera* Guenee, 1852**

El género *Spodoptera* Guenee, 1852 (Noctuidae: Amphipyridae) está compuesto por un grupo de especies de polillas que son consideradas plagas de gran impacto económico, debido a que se alimentan de una amplia variedad de cultivos, principalmente gramíneas como el maíz y la caña de azúcar entre otros. Las larvas de este género atacan el follaje, los granos en desarrollo y los frutos de estos cultivos. La mayoría de sus especies, se encuentran distribuidas en el hemisferio occidental, aunque algunas de ellas se encuentran en el hemisferio oriental. Entre las especies más conocidas en el continente americano se encuentran: *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *S. ornithogalli* (Guenee), *S. albula* (Walker), *S. exigua* (Hübner), *S. eridania* (Stoll), *S. androgea* (Stoll), *S. latifascia* (Walker), *S. dolichos* (Fabricius) y *S. pulchella* (Herrich-Schäffer) (Saldamando & Marquez, 2012).

##### **3.1.1. *Spodoptera frugiperda***

Las larvas de *S. frugiperda* también llamadas “gusano cogollero” son una de las plagas de gran importancia económica en México, debido a que provoca hasta un 40% de pérdidas en campo (López, 2017). Los ataques tempranos a las plantas por las larvas pueden afectar estados vegetativos de desarrollo de la planta, mientras que los tardíos pueden dañar las espigas (Aragón, 2002).

##### **3.1.2. Clasificación taxonómica**

La clasificación taxonómica del gusano cogollero según Borror *et al.*, (1989)

Clase: Insecta

Orden: Lepidóptera

Familia: Noctuidae

Subfamilia: Amphipyrinae

Género: *Spodoptera*

Especie: *frugiperda* (Smith)

### **3.1.3. Origen y distribución geográfica**

El origen de *S. frugiperda* no está aún bien definido, sin embargo, algunos autores coinciden en que esta especie tiene su origen en los trópicos del continente americano, se le ha encontrado desde el sureste de Canadá hasta Chile y Argentina; frecuentemente es abundante en las áreas agrícolas. Es una especie de distribución tropical, aunque se le encuentra también en zonas templadas. Es una especie endémica del continente americano, en México se encuentra ampliamente distribuida en todas las zonas agrícolas, principalmente en los estados de Michoacán, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Veracruz, Quintana Roo, Yucatán, Coahuila, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Valle de México, Durango, Guanajuato, Baja California Norte, Baja California Sur y Colima (Flores, 2000).

### **3.1.4. Ciclo biológico de *S. frugiperda***

El gusano cogollero presenta una metamorfosis completa, lo que quiere decir que pasa por 4 estadios: huevo, larva, pupa y adulto. Primero, los adultos colocan masas de aproximadamente 100 huevos en el envés de las hojas, los cuales están parcialmente protegidos por una telilla que la hembra excreta al momento de la ovoposición; se ha observado que los huevos pueden ser colocados en malezas del cultivo; la duración en estado de huevo es de 3 a 5 días, posteriormente los huevos eclosionan y las larvas comienzan a alimentarse de las hojas. En la etapa larval, *S. frugiperda* presenta de 5 a 7 estadios larvales, caracterizados por diferentes rangos del ancho de la región cefálica. Las larvas en los últimos estadios presentan en la cabeza, áreas frontales de color blanco-amarillo, en forma de “Y” invertida. Posteriormente llegan a la etapa de pupa, la cual se

desarrolla en el suelo, es de color café rojizo y mide entre 14 y 18 mm de longitud. Finalmente llegan a la etapa adulta, el cual es una palomilla de color café grisáceo que mide alrededor de 3 centímetros con las alas extendidas. Las alas del macho son de un color café más claro que el de las hembras y tienen una mancha transversal de color blanco cremoso (López, 2017).

### **3.1.5. Cultivos afectados por *S. frugiperda***

*S. frugiperda* muestra una serie muy amplia de hospederos, con más de 80 especies de plantas registradas, pero es evidente que prefiere gramíneas como el sorgo, zacate bermuda, el maíz y caña de azúcar (López, 2017). Las larvas se localizan en la yema apical, conocida coloquialmente como “el cogollo” de las plantas, en donde se alimentan de las hojas en formación, las cuales al desarrollarse quedan perforadas y rasgadas, el ataque temprano causa la muerte de la planta o el retraso en su desarrollo. La mayor reducción del rendimiento sucede cuando la defoliación se presenta en etapas vegetativas avanzadas y en las etapas reproductivas (Flores, 2000; Pérez, 2017). En México, las pérdidas reportadas en los cultivos de maíz por este insecto van de 30% al 40%. El maíz es considerado el cultivo más importante en México, tiene una participación del 18% del valor de producción del sector agrícola y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional, que se traduce en 7.5 millones de hectáreas aproximadamente (SIAP, 2018). Además, el maíz forma parte de la alimentación diaria de los mexicanos, tiene un valor nutricional alto, y puede ser utilizado en diferentes etapas de su maduración; la utilidad de ésta gramínea es muy amplia, se ocupan sus hojas, mazorcas y granos, puede utilizarse para realizar una gran variedad de platillos, alimentar al ganado, o bien, se puede utilizar para obtener o producir diversos insumos como aceites, barnices, pinturas, cauchos artificiales y jabones, así como para la producción de algunas bebidas alcohólicas como charanda y ron (SIAP, 2016). Por otra parte, la caña de azúcar es también un cultivo de suma



importancia económica y social en México, debido a que ofrece más de 440 mil empleos de forma directa en las regiones cañeras del país y 2.2 millones de manera indirecta, así como por su valor de producción y el tipo de consumo que tiene su producto final, ya que el azúcar forma parte de los 5 productos básicos alimenticios para la población mexicana junto con el maíz, frijol, trigo y café, además de tener una gran demanda en la industria alimentaria (Valseca *et al.*, 2003; SEGOB, 2014). Si bien la caña de azúcar es utilizada generalmente para la producción de azúcar refinada, no es su único uso, también se aprovecha como materia prima para una diversa gama de productos como lo es el papel, cemento, abonos, alimento animal y bioetanol. Otro porcentaje de la caña de azúcar tiene como finalidad la fabricación de piloncillo y endulzantes, así como para su venta como fruta estacional (SIAP, 2014).

## **2.2. Control biológico**

Dentro de las estrategias para el control y manejo de los insectos plaga de maíz y caña de azúcar, se encuentran el control químico, sin embargo, el uso excesivo de los productos químicos trae consigo diversas problemáticas como la contaminación del suelo y mantos freáticos, efectos tóxicos en animales y al hombre, además, al no ser insecticidas específicos producen la muerte de los enemigos naturales de la misma plagas y de otros organismos benéficos como las abejas, aunado a esto, las plagas también generan resistencia a los productos químicos, por lo que se buscan otras alternativas como el control biológico, donde se identifican los enemigos naturales de los insectos plagas con el fin de obtener un control eficiente de los mismos. Los enemigos naturales de las plagas son parasitoides, depredadores, microorganismos antagonistas y microorganismos entomopatógenos (Motta & Murcia, 2011). Estos últimos son capaces de causar enfermedad y muerte a diversos insectos (Téllez *et al.* 2009), siendo así, reguladores de las poblaciones, debido a que poseen especificidad. Dentro de los microorganismos entomopatógenos se incluyen bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos (Badii & Abreu, 2006).

Existen bacterias entomopatógenas que se emplean para el control de plagas en cultivos de la caña de azúcar y maíz. *Bacillus thuringiensis* es una de las bacterias mayormente utilizadas para el control de insectos del orden Lepidóptera, tal es el caso de la cepa B-148 que fue aislada de un cadáver de *Diatraea magnifactella* presentando una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 254.01 ng cm<sup>-2</sup> en dieta merídica sobre *D. magnifactella* (Fonseca, 2011), mientras que en hoja de caña de azúcar fue de 2.3 µg cm<sup>-2</sup> y de 4.3 µg cm<sup>-2</sup> en hoja de maíz (Buenosaires, 2014); Por otra parte, la cepa GP919, aislada de un cadáver de insecto del orden Hemíptera, familia Aphididae, presentó una CL<sub>50</sub> de 1.22 ng cm<sup>-2</sup> sobre *D. magnifactella* (Vásquez-Benites, 2016). También se han encontrado cepas de *B. thuringiensis* patógenas a *S. frugiperda*, la cepa UCLA-10 aislada de suelo presentó un porcentaje de mortalidad del 90% sobre *S. frugiperda* (Carmona, 2002). Monnerat *et al.* (2007) reporta 1400 aislados de *B. thuringiensis* aisladas de suelo de diversos lugares de Brasil, de los cuales, 27 aislados presentaron 100% de mortalidad sobre *S. frugiperda*, *Plutella xylostella* y *Anticarsia gemmatalis*. Del Rincón-Castro *et al* (2006) evaluó los cristales puros de las cepas LBIT-181, LBIT-193 y LBIT-27 de *B. thuringiensis* aisladas de suelo del estado de Guanajuato, encontrando una CL<sub>50</sub> de 3.867 µg/cm<sup>2</sup>, 3.966 µg/cm<sup>2</sup> y 7.636 µg/cm<sup>2</sup> respectivamente

### **2.2.1. Generalidades de *B. thuringiensis***

*B. thuringiensis* fue descubierto en Japón por Shigetane Ishiwata (1901) como agente causal de la enfermedad sotto en las larvas de los gusanos de seda (*Bombyx mori*) (Ishiwata 1901). Lo llamó Sottokin, que significa "bacilo de muerte súbita" y describió la patología que causa en las larvas del gusano de seda y sus características culturales. También señaló que muchas de las larvas que no murieron al ser expuestas al bacilo eran muy débiles y atrofiadas. En un informe posterior, afirmó que desde el principio se comprendió que una toxina estaba implicada en la patogenicidad de *B. thuringiensis*. Su identificación no fue completa, y la primera descripción morfológicamente válida fue hecha por el bacteriólogo alemán Ernst

Berliner (1915), que aisló el bacilo de la polilla mediterránea de la harina (*Anagasta kuehniella*). La llamó *Bacillus thuringiensis*, que se deriva de Turingia, la ciudad alemana donde se encontró la polilla (Sansinenea, 2012).

Se sabe que *B. thuringiensis* es un bacilo gram positivo, de flagelación períftrica, que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1.2  $\mu\text{m}$  de ancho, aerobio facultativo. Los distintos aislamientos de *B. thuringiensis* presentan en general características bioquímicas comunes. Poseen la capacidad de consumir glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina. Sin embargo, la característica principal de *B. thuringiensis* es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (Sauka & Benintende, 2008). Durante su ciclo de vida, *B. thuringiensis* presenta dos etapas bien diferenciadas: la primera es la etapa de crecimiento vegetativo, donde se duplica por bipartición (30-90 min) y la segunda es la etapa de esporulación, cuando las condiciones del medio y los nutrientes son limitados. Para la mayoría de las variedades de *B. thuringiensis*, en la fase de esporulación se lleva a cabo la liberación de los cristales proteicos con actividad insecticida. Estos cristales llamados Vip, Cry o Cyt se encuentran dentro del esporangio y fuera del exosporio de la spora, llegando a representar poco más del 30% del peso seco de éste última; son biodegradables y pueden ser degradados por microorganismos del suelo e inactivados por la luz ultravioleta (Velazquez-Benites, 2016). Estas toxinas pueden presentar distintas morfologías y se clasifican en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y en otras formas atípicas menos frecuentes. Las proteínas Cry1 son las mayormente usadas a nivel mundial para el control de insectos del orden lepidóptera, incluyendo *S. frugiperda*, estos cristales tienen forma bipiramidal y un peso aproximado de 130 kDa (Monnerat *et. al.*, 2007). *B. thuringiensis var. kurstaki* HD-1 es la cepa más utilizada para

el control de insectos lepidópteros, plagas agrícolas y forestales. Esta cepa fue aislada originalmente por Dulmage en 1970, y resultó ser hasta 200 veces más tóxica para algunos lepidópteros que las otras cepas utilizadas en los productos de aquella época. En la actualidad se venden muchos insecticidas a base de *B. thuringiensis* contra diferentes especies de lepidópteros, algunos ejemplos de marcas comerciales son Dipel, Bernan Bt, Bathurin, Biospor, Able, Vault, entre otros (Sauka & Benintende, 2008). También se ha utilizado la ingeniería genética para desarrollar plantas que expresan el gen Cry de *B. thuringiensis*, estas plantas son llamadas comúnmente “plantas Bt”. Las ventajas de este tipo de cultivos es que disminuye la necesidad de aplicar insecticidas y dan protección a las plantas. Además, los únicos insectos afectados por la toxina son aquellos que se encuentran alimentándose de los cultivos y no otros (Khetan, 2001; Hossain, *et al.*, 2004; Sauka & Benintende, 2008). Sin embargo, también se tienen reportes de insectos resistentes a estos cultivos, tal es el caso de *Sesamia nonagroides* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) resistentes a cultivos de maíz genéticamente modificados en España, el mismo caso se dio en cultivos de algodón, donde larvas de *Helicoverpa armigera* presentaron resistencia a la toxina (Melo *et al.*, 2014).

El modo de acción de *B. thuringiensis* contra lepidópteros se describe a continuación: los cristales deben ser ingeridos para tener un efecto. Después de la ingestión, los cristales se solubilizan por las condiciones alcalinas en el intestino medio del insecto y posteriormente se convierten proteolíticamente en un fragmento de núcleo tóxico (Bravo *et al.*, 2007). Bajo las condiciones altamente ácidas del estómago, los cristales de proteína Cry y Cyt pueden disolverse, pero una vez en solución se degradan rápidamente a péptidos no tóxicos por jugos gástricos, típicamente en menos de 2 min. Durante la activación proteolítica, los péptidos del extremo N y del extremo C se escinden de la proteína completa. La toxina activada se une a los receptores (glicoproteína o

glicolípido) localizados en las membranas de la microvellosidad media apical del intestino del insecto. Para algunas toxinas, se han descrito al menos cuatro sitios de unión distintos en diferentes insectos lepidópteros, estas son: una proteína de tipo cadherina (CADR), una aminopeptidasa N (APN) de glucosilfosfatidil-inositol (GPI) fosfatasa (ALP) y un glicoconjugado de 270 kDa. Después de la unión, la toxina adopta una conformación que permite su inserción en la membrana celular y forma un canal selectivo de cationes. Posteriormente, la oligomerización se produce, y este oligómero forma un canal de poro o de iones. Una vez que se ha formado un número suficiente de estos canales, un exceso de cationes, por ejemplo, K<sup>+</sup>, entra en la célula (Pardo-Lopez *et al.*, 2013). Esto causa un desequilibrio osmótico dentro de la célula. Este proceso, denominado lisis inducida por coloides-osmóticos, continúa hasta que la célula se rompe, y cuando se ha destruido un número suficiente de células, el epitelio del intestino medio pierde su integridad, esto permite que los jugos intestinales alcalinos y las bacterias atraviesen la membrana basal del intestino medio, dando como resultado la muerte en especies de lepidópteros (Sansinenea, 2012). Tras ocurrir la infección, los signos del insecto infectado son visibles y consecutivos, empezando por el cese de la alimentación, la pérdida de peso y líquidos, el regurgitamiento intestinal acompañados de una motilidad lenta, sobreviniendo la parálisis del tracto digestivo (misma que puede durar horas o días) y finalmente, la muerte (Vazquez-Benites,2016). Sin embargo aunque se cuente con este y otros microorganismos entomopatógenos, las plagas que tienen hábitos crípticos como algunos barrenadores son muy difíciles de controlar, por lo que emplear microorganismos endófitos entomopatógenos es una alternativa promisoría para su control.

## **2.2. Microorganismos endófitos**

El término “endófito” se usa para referirse a microorganismos que habitan dentro de los tejidos de la planta, sin causar daños a su hospedero (Vega *et al.* 2008). Los microorganismos endófitos comprenden especialmente

hongos y bacterias que colonizan tejidos internos de la planta, formando una relación simbiótica, es decir, que especies diferentes tienen una interacción biológica estrecha, y por lo general, al menos uno obtiene beneficios (Escolástico, 2013). Las bacterias endófitas tienen ventajas sobre las bacterias rizosféricas, gracias a la alta disponibilidad de nutrientes de que disponen y la protección que les brinda la planta hospedera de las condiciones adversas del medio (Rodríguez *et al.* 2005).

### **2.2.1. Colonización de endófitos bacterianos**

Muchos endófitos bacterianos se originan en la rizósfera, se sugiere que la entrada de endófitos bacterianos en las raíces ocurre vía la colonización de pelos radiculares, promovida por los exudados de la raíz. Hasta cierto punto, el tallo y las superficies foliares también producen exudados que atraen microorganismos (Hardoim *et al.*, 2015). Sin embargo, la luz UV, la falta de nutrientes y la desecación, generalmente reducen la colonización de las superficies de las plantas, y sólo las bacterias adaptadas pueden sobrevivir y entrar a través de estomas, heridas e hidátodos. Los endófitos también pueden penetrar en las plantas a través de flores y frutos.

Se ha demostrado que las bacterias colonizan los vasos del xilema y que los agujeros de las placas de perforación entre los elementos del xilema son suficientemente grandes para permitir el paso bacteriano (Compant, Clément, & Sessitsch, 2010).

### **2.2.2. Función de los microorganismos endófitos**

Las bacterias endófitas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios que pueden afectar la sobrevivencia y rendimiento de la planta, por lo que son motivo de interés en la agricultura (Perez & Chamorro, 2013). Dentro de algunas funciones que las bacterias endófitas ejercen sobre la planta, se encuentra la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar nutrientes minerales, producir fitohormonas, vitaminas y enzimas, modulando el crecimiento en plantas como la caña de azúcar, en la que también se han aislado y reportado bacterias que suprimen el crecimiento

de fitopatógenos (Saravanan *et al.*, 2007). Los endófitos también han resultado efectivos en la biorremediación, por la capacidad que poseen para degradar compuestos complejos, además, son una buena fuente de moléculas bioactivas, con distintas funciones, entre las que se encuentran antibióticos, inmunosupresores, agentes anticancerígenos, y agentes de control biológico (Nair & Padmavathy, 2014).

### **2.2.3. Microorganismos endófitos como promotores de crecimiento**

Diferentes autores reportan microorganismos endófitos con actividad promotora de crecimiento, estos microorganismos además de aportar nutrientes útiles en el desarrollo de la planta como nitrógeno y fósforo, pueden promover la producción de hormonas de crecimiento o de algún otro metabolito que contribuya con el crecimiento de su hospedero (Doncel *et al.*, 2016). Se han logrado aislar bacterias endófitas de maíz y caña de azúcar, tal es el caso de *Herbaspirillum seropedicae*, la cual presenta actividad promotora de crecimiento (Rives *et al.*, 2007). En tomate y pepino, algunas bacterias del género *Bacillus sp.* y *Aureobacterium sp.* fueron reportadas como endófitas promotoras de crecimiento en tomate y pepino debido a la producción de auxinas, giberelinas y sideróforos, además, se confirmó su capacidad para traslocarse de la raíz a la parte aérea de la planta (Castro, 2006). También se conoce la capacidad de las especies del género *Bacillus sp.* para inducir resistencia contra patógenos (Ramírez, 2010). Otros autores sugieren que el efecto de estos microorganismos en las plantas se debe a la fijación de nitrógeno y a la producción de citocininas por parte de las bacterias (Torriente, 2006). Especies del género *Bacillus sp.* se han aislado de maíz, caña de azúcar, zanahoria, raíz de papa, hojas de uva, algodón y algunos cítricos.

En 2012 Giridhar *et al.*, reportaron una cepa de *B. thuringiensis* con actividad promotora de crecimiento en *Alnus firma*, las plantas inoculadas con la bacteria en comparación con el control presentaron cerca de un 40%

de incremento en la longitud de la raíz y en la altura de la planta, así como un 70% en el peso seco.

#### **2.2.4. Microorganismos endófitos como agentes de control biológico**

La eficacia de los microorganismos endófitos como una fuente de control biológico depende de varios factores como la especificidad del hospedero, la dinámica poblacional, la capacidad de moverse dentro de los tejidos y la capacidad de inducir resistencia sistémica (Perez & Chamorro, 2013). Se ha registrado a hongos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, con actividad endófito, estos microorganismos han sido aislados de diferentes plantas e inoculados nuevamente, presentando actividad insecticida y promoción de crecimiento (Russo, 2017). Por otra parte, varios reportes demuestran la capacidad endófito de *B. thuringiensis* en distintos hospederos; algunos estudios indican que puede ser transportada desde el suelo hasta las hojas, o bien, pueden inocularse en semilla y permanecer en la planta durante su crecimiento. Se han reportado semillas de coles inoculadas con *B. thuringiensis*, en donde se demostró que la bacteria permanece dentro de la planta después de germinar (Botelho *et al.*, 2012). Otros autores observaron la actividad endófito de *B. thuringiensis* en raíz de *Arabidopsis thaliana in vitro* (Vidal, *et al.*, 2013). Además, *B. thuringiensis* se reporta como endófito con actividad insecticida en algodón y en col, sobre *S. frugiperda* y *Plutella xylostella* (Gomes *et al.*, 2009). También se tienen reportes de *B. thuringiensis* aislado como endófito en caña de azúcar; la cepa Y15 se aisló de hoja de caña de azúcar, presentando una  $CL_{50}$  DE 52 ng/cm<sup>2</sup> sobre *D. magnificella* (Ocampo, 2013; Hernández, 2015).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El maíz y la caña de azúcar son cultivos de gran importancia económica e industrial en la República Mexicana, dichos cultivos se ven afectado por la plaga del gusano cogollero *S. frugiperda*. Los insectos barrenadores pueden llegar a ocasionar pérdidas de hasta el 50% de la producción, lo



que se traduce en cientos de millones de pesos al año. Para controlar ésta plaga se han aplicado insecticidas químicos. Sin embargo, debido a que *S. frugiperda* puede encontrarse dentro del cogollo del maíz, éstas medidas de control han resultado poco efectivas, además de provocar efectos tóxicos a la salud y al ambiente; por lo que se han buscado estrategias de control biológico para reducir los niveles poblacionales de insectos plaga, evitando así los impactos negativos de los insecticidas químicos. Dentro de las estrategias para el control de plagas, se encuentra el uso de bacterias endófitas entomopatógenas, que tienen la capacidad de habitar dentro de los tejidos de la planta sin causar daño aparente a su hospedero. Debido a la biología y hábitos de los barrenadores, el estudio y la evaluación de microorganismos endófitos pueden sentar las bases para la generación de estrategias útiles en el control de *S. frugiperda*.

#### **4. HIPOTESIS**

La cepa Y15 de *B. thuringiensis* aislada de cultivos de caña de azúcar tendrán actividad endófitas como inductor de crecimiento e insecticida en plantas de maíz y caña de azúcar infestadas con *S. frugiperda*.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad endófitas de *B. thuringiensis* en maíz y caña de azúcar, así como su patogenicidad sobre *S. frugiperda*.

##### **5.1. Objetivos específicos**

- Determinar la actividad endófitas de *B. thuringiensis* en maíz.
- Determinar la actividad endófitas de *B. thuringiensis* en caña de azúcar.
- Evaluar la actividad insecticida de *B. thuringiensis* sobre *S. frugiperda* en hojas de maíz y caña de azúcar.

- Determinar la actividad promotora de crecimiento de *B. thuringiensis* en caña de azúcar y maíz en condiciones de invernadero.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Estrategia metodológica**

La estrategia experimental (Figura 1) de éste trabajo se basa en realizar bioensayos en caña de azúcar y maíz en condiciones de laboratorio e invernadero con la cepa Y15 de *B. thuringiensis* sobre *S. frugiperda*.

Los experimentos *in vitro* se realizaron en las instalaciones del laboratorio de Botánica Estructural y el laboratorio de Control Biológico de Plagas, ubicados en el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), así como en el laboratorio de Parasitología Vegetal ubicado en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB); mientras que los experimentos *in vivo* se realizaron en el invernadero del CIB, ambos centros de investigación se encuentran ubicados en el campus norte de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en la colonia Chamilpa del municipio de Cuernavaca, Morelos.



Figura 1. Esquema de la estrategia experimental

## 6.2. Material biológico

### 6.2.1. Material vegetal

Las semillas de maíz de la variedad UAEM-BD1 se compraron en el municipio de Cuautla, en el Instituto Profesional de la Región Oriente (IPRO); las plantas de caña de azúcar de 2 meses de edad libres de microorganismos de la variedad MEX. 57-473, se obtuvieron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Central Motzorongo S.A. de C. V. Las plántulas se transfirieron a macetas con sustrato estéril y se conservan en el invernadero del Centro de Investigaciones Biológicas.

### 6.2.2. Insectos

Las larvas de *S. frugiperda* fueron proporcionadas por la M. en C. Laura Patricia Lina García del laboratorio de Control Biológico de Plagas del CEIB.

### 6.2.3. Cepa bacteriana y plásmido

Se utilizó la cepa Y15 de *B. thuringiensis* de la colección de bacterias del laboratorio de Parasitología Vegetal, aislada como endófita de caña de azúcar (Ocampo, 2013) y la cepa HD73::GFP donada por el Dr. Jorge Eugenio Ibarra del CINVESTAV, Irapuato.

Para facilitar la identificación de la cepa Y15 en los tejidos de la planta hospedera, se empleó la proteína verde fluorescente (o GFP por sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein), codificada por el gen *gfp*<sup>+</sup> presente en el plásmido p-MUTIN-GFP<sup>+</sup> (Figura 2), proporcionado por el Dr. Ibarra. Este plásmido consta de 6192 pares de bases, contiene un gen que le confiere resistencia a eritromicina, un promotor PSPAC, el operón *lacI*, un sitio *trpA* terminador, un sitio de replicación y el gen *bla* que codifica para enzimas  $\beta$ -lactamasa.

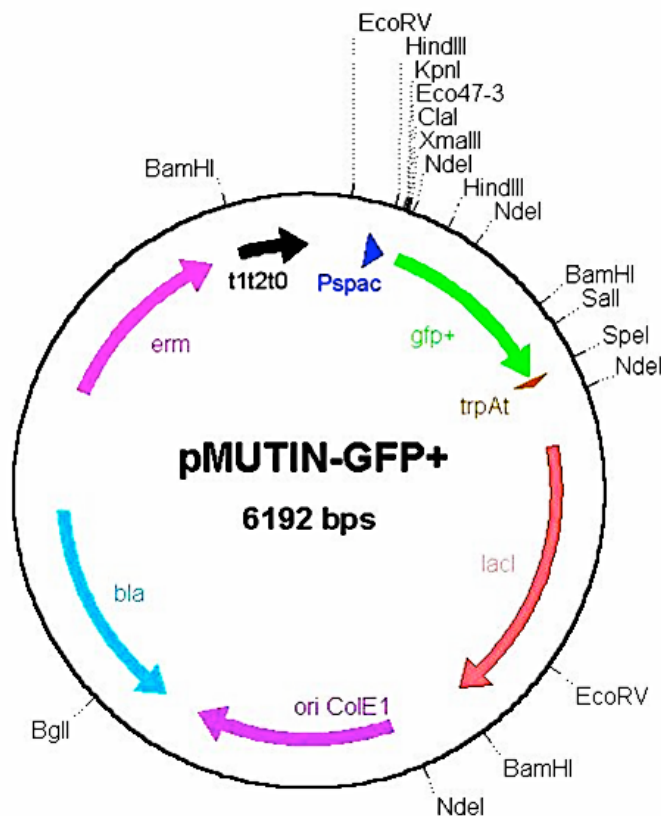


Figura 2. Mapa del vector pMUTIN-GFP+. Tomada de [www.genetik.uni-bayreuth.de](http://www.genetik.uni-bayreuth.de). University of Bayreuth, Alemania.

#### 6.2.4. Transformación de *B. thuringiensis* con el plásmido pMutin-GFP<sup>+</sup>

La transformación de células electrocompetentes de la cepa Y15 de *B. thuringiensis* con el vector p-MUTIN-GFP<sup>+</sup> se realizó siguiendo el protocolo de García, 2016. Las colonias transformadas se seleccionaron en medio LB sólido suplementado con eritromicina (30 µg/L). Brevemente, se describe el proceso de transformación de la cepa Y15; se sembraron las bacterias en cajas Petri con medio de cultivo sólido LB, al día siguiente, se tomó una asada de las cajas y se inocularon matraces de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo Spizizen, dejándolas crecer a 250 RPM y 28°C hasta alcanzar una  $DO_{650} = 0.9$ , una vez alcanzada la densidad óptica, se sacaron los matraces y se recuperó el cultivo en tubos falcon de 50 mililitros para llevar a centrifugación a 5,000 RPM durante 10 minutos a 4°C, se retiró el

sobrenadante y enseguida se realizaron tres lavados con agua estéril doblemente destilada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) fría, se centrifugó a las mismas condiciones mencionadas antes. Posteriormente se resuspendió el cultivo en PEG<sub>3600</sub> al 40% manteniéndolo en hielo todo el tiempo. Finalmente se tomaron 800 µL de las células y 800 ng de DNA en cubetas de electroporación de 0.4 cm y se realizó la electroporación a 2.3 kilovolts, al finalizar la electroporación las células transformadas se dejaron en incubación en tubos eppendorf con medio LB líquido por 2 horas en agitación. Después de transcurridas las 2 horas, se centrifugó el medio de cultivo de los tubos eppendorf a 10,000 RPM finalmente se retiró el sobrenadante y el pellet se plaqueó en una caja Petri con medio de cultivo LB con antibiótico. Todas las colonias que crecen en la caja Petri se observan en microscopio de epi-fluorescencia para ver las células fluorescentes. La cepa transformada fue nombrada Y15::GFP.

#### **6.2.5. Extracción de DNA plasmídico**

Con la finalidad de asegurarnos de que el plásmido se encontraba dentro de las células de *B. thuringiensis* se hizo la extracción del DNA plasmídico.

Se tomó una colonia de la cepa Y15 putativamente transformada y la cepa HD73::GFP de una caja petri y se inoculó cada una por separado en un matraz con 3 mL de medio de cultivo LB, se dejaron crecer toda la noche a 28°C y 250 RPM. Al día siguiente se vació el medio de cultivo en tubos eppendorf y se centrifugó 10 minutos a 6,000 RPM, se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado de la pastilla con 500µL de la solución de Birboim 1 (Apendice 1); nuevamente se centrifugó a 6,000 RPM por 5 minutos y resuspendió la pastilla en 500µL de la solución Birboim 1 con 10 mg/mL de lisozima y 3 µL de RNAsa, los tubos se llevaron a incubación durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente se incubaron en hielo durante 10 minutos, se agregaron 500 µL de la solución birboim 2 (Apendice 1) y se mezclaron por inversión, se dejaron incubar en hielo por 5 minutos, después se adicionaron 300 µL de la solución de birboim 3 (Apendice 1) y se resuspendieron suavemente, para incubarse en hielo por 30 minutos,

pasado el tiempo se centrifugaron a 13,000 RPM por 15 minutos, se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf estériles y se le adicionaron 600 µL de isopropanol, finalmente se realizó una centrifugación a 13,000 RPM por 10 minutos y se desechó el sobrenadante, la pastilla se dejó secar en campana de flujo laminar.

Una vez extraído el DNA plasmídico se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar el peso del plásmido.

#### **6.2.6. Establecimiento de plántulas de maíz en condiciones controladas**

Para evaluar la actividad endófitica de la cepa Y15 de *B. thuringiensis* se realizaron bioensayos en plántulas de maíz; a continuación, se describe la metodología para establecer las plántulas de maíz en condiciones controladas.

Se realizó una mezcla de peat moss, vermiculita y agrolita en proporción 1:1:1, dicha mezcla se esterilizó en frascos de vidrio con 50 mL de agua destilada durante 1 hora a una temperatura de 121°C y 20 lb de presión, cada frasco contenía 300 gramos de la mezcla. La boca del frasco fue cubierta con papel aluminio.

Las semillas de maíz se lavaron con agua corriente durante 15 minutos, posteriormente se llevaron a la campana de flujo laminar donde se colocaron en un recipiente con etanol al 70% por 10 minutos, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril, después se adicionó hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 10% por 5 minutos, nuevamente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril, finalmente se dejaron secar sobre toallas de papel estériles. Para la germinación se inocularon 3 semillas por cada frasco con sustrato. Un total de 60 frascos fueron sembradas e incubadas a 25°C en condiciones de fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

### 6.2.7. Evaluación de la actividad endófitas de *B. thuringiensis* en plántulas de maíz en condiciones controladas

Para evaluar la actividad endófitas de *B. thuringiensis* CEPA Y15::GFP, semillas y plántulas de maíz de 7 días de edad fueron inoculadas con una solución bacteriana con una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml de agua. Las semillas fueron sumergidas por 2 horas en la solución, posteriormente se sembraron e incubaron por 7 días en una cámara de crecimiento hasta su germinación y desarrollo. Las plantas de maíz de 7 días de edad se inocularon a través de su sistema radicular, adicionando al sustrato la solución bacteriana. Los tratamientos se presentan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Tratamientos para la evaluación de la actividad endófitas de *B. thuringiensis* cepa Y15::GFP en plantas de maíz

Tratamiento	Lugar de aplicación	Solución bacteriana ( $1 \times 10^8$ células/ml)
T1	Semilla	Cepa Y15::GFP
T2	Semilla	Agua estéril
T3	Sustrato	Cepa Y15::GFP
T4	Sustrato	Agua estéril

Se realizó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y tres repeticiones cada uno. Para cada repetición se utilizaron 10 frascos con una plántula de maíz.

Para comprobar que la bacteria logra entrar a la planta se realizaron realisamientos de la cepa Y15::GFP de los tejidos de maíz, para la cual, se desinfectó superficialmente los tejidos de caña de azúcar como se describe a continuación. Las muestras se lavaron con agua corriente para eliminar la tierra y cualquier otro contaminante. Una vez lavadas, se cortaron muestras de raíz, hoja, y tallo. Para desinfectar, se llevaron las muestras a la campana de flujo laminar, las muestras fueron desinfectadas de manera



individual, se siguió el tren de desinfección: etanol al 70% (1 min), hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 0.8% (2 min), etanol al 70% (1 min), por último, se realizan tres lavados con agua destilada estéril (1 min).

Las muestras se secaron en toallas de papel estériles, y los bordes se cortaron con ayuda de un bisturí, eliminando el tejido muerto que se obtiene después de realizar el proceso de lavado, los tejidos se colocaron en cajas Petri con medio LB con eritromicina (30 µg/L ) y se dejaron en incubación a 28°C por 48 horas.

Por otra parte, también se realizaron cortes transversales y longitudinales de tejidos de plantas de maíz de 15 días de edad para observar las células transformantes de *B. thuringiensis* dentro de los tejidos de la planta. Previamente se lavaron con abundante agua corriente, seguido de una desinfección superficial con alcohol y toallas de papel estériles. Posteriormente se realizaron los cortes con navajas de afeitar en raíz, tallo y hoja, las muestras se colocaron en un portaobjetos y se llevaron al microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico, ubicado en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada del Instituto de Biotecnología.

### **6.3. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de *B. thuringiensis* en maíz en condiciones de invernadero**

Cultivos de maíz fueron establecidos en condiciones de invernadero, se empleó como sustrato una mezcla de peat moss y vermiculita en proporción 1:1. El sustrato fue esterilizado en autoclave durante 1 hora a una temperatura de 121°C antes de ser utilizado. Las semillas fueron desinfectadas sumergiéndolas en etanol al 70% por 5 minutos, seguida de una inmersión en cloro (Cloralex®) al 5% por 10 minutos y finalmente, 3 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se colocaron un instante en contacto directo con medio de cultivo LB (Luria Bertani) en placas de Petri, el medio fue incubado a 25°C por 7 días, esto con el objetivo de verificar la desinfección. Luego las semillas se dejan

secar en papel filtro previamente esterilizado por 20 minutos y se transfieren a macetas con el sustrato esterilizado. El riego se realizó cada tercer día con 300 mL de agua estéril, y no se le agregarán fertilizantes (Muvea *et al.*, 2014). Plantas de 15 días de edad fueron empleadas para la evaluación de la actividad promotora de crecimiento en maíz.

Para evaluar la actividad promotora del crecimiento de *B. thuringiensis*, semillas de maíz fueron sumergidas por dos horas en una solución bacteriana de ( $1 \times 10^8$  células/ml) y después germinadas en condiciones de invernadero. También se determinó el efecto de la bacteria en el desarrollo y crecimiento del maíz al ser aplicado en el follaje o en el sustrato. Los tratamientos con la bacteria se presentan en el Cuadro 2. Se realizó un diseño de bloques completamente al azar, con 6 tratamientos y 3 repeticiones cada uno, como unidad experimental se utilizó una maceta con una planta de maíz. Después de 40 días post inoculación se midieron la altura y el peso seco de las plántulas de maíz.

### **6.3.1. Evaluación de la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* en plántulas de maíz sobre *S. frugiperda* en condiciones controladas**

Para evaluar la actividad entomopatógena de la cepa Y15::GFP de *B. thuringiensis* se realizaron los mismos tratamientos descritos en el apartado 6.2.7. Se realizó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 3 repeticiones cada uno, en total se utilizaron 120 frascos con 1 planta de maíz de 7 días de edad cada uno y una larva de *S. frugiperda* de tercer instar, se mantuvieron a 25°C con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. El bioensayo tuvo una duración de 15 días.

Cuadro 2. Tratamientos para la evaluación de la actividad promotora de crecimiento de *B. thuringiensis* en maíz en condiciones de invernadero

<b>Tratamiento</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Solución bacteriana (<math>1 \times 10^8</math> células/ml)</b>
<b>en:</b>		
<b>T1</b>	Semilla	Cepa Y15
<b>T2</b>	Semilla	Agua estéril
<b>T3</b>	Sustrato	Cepa Y15
<b>T4</b>	Sustrato	Agua estéril
<b>T5</b>	Follaje	Cepa Y15
<b>T6</b>	Follaje	Agua estéril

### 6.3.2. Evaluación de la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* en hojas de maíz

Para evaluar la actividad insecticida de *B. thuringiensis*, cepa Y15, se inoculó una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml en follaje o sustrato de plantas de maíz; los tratamientos a evaluar se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos para la evaluación de la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* en hojas de maíz.

Tratamiento	Aplicación en:	Solución bacteriana ( $1 \times 10^8$ células/ml)
T1	Sustrato	Cepa Y15
T2	Follaje	Cepa Y15 + Tween 80 al 0.01%
T3	Follaje	Cepa Y15
T4	Sustrato	Cepa Y15 + Tween 80 al 0.01%
T5	Follaje y sustrato	Agua estéril
T6	Follaje y sustrato	Tween 80 al 0.01%

Después de 7 días post inoculación, se tomaron hojas de maíz de cada tratamiento y se cortaron fragmentos de 1.5 x 2 cm, se realizó una desinfección superficial y cada fragmento de hoja se colocó en una caja Petri con agar-agar para mantener la humedad, también se colocó en cada hoja una larva neonata de *S. frugiperda*. Se realizó un diseño completamente al azar, con 6 tratamientos y 3 repeticiones cada uno. El bioensayo tuvo una duración de 7 días.

### 6.3.3. Establecimiento del cultivo de caña de azúcar bajo condiciones de invernadero

Las plantas de caña de azúcar se trasplantaron en macetas con sustrato previamente esterilizado de peat moss y vermiculita (proporción 1:1). Se trasplantaron un total de 200 plantas de caña de azúcar. En invernadero las plantas se regaron cada tercer día sin la adición de fertilizantes (Muvea *et al.*, 2014).

### 6.3.4. Evaluación de la actividad endófito de *B. thuringiensis* en caña de azúcar en condiciones de invernadero

Con la finalidad de conocer las mejores condiciones para la inoculación y colonización de *B. thuringiensis* cepa Y15 sobre plantas de caña de azúcar, se realizó el siguiente bioensayo. Plantas de dos meses de edad, fueron

inoculadas con solución bacteriana sobre el follaje o sustrato ( $1 \times 10^8$  células/ml). Para mejorar las condiciones de penetración de la bacteria se adicionó Tween 80. Los controles fueron agua destilada estéril y Tween 80 al 0.01% aplicados sobre follaje y sustrato, los tratamientos se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos para la evaluación de la actividad endófito de *B. thuringiensis* en caña de azúcar en condiciones de invernadero.

<b>Tratamiento</b>	<b>Aplicación en:</b>	<b>Solución bacteriana (<math>1 \times 10^8</math> células/ml)</b>
<b>T1</b>	Follaje	Cepa Y15
<b>T2</b>	Follaje	Cepa Y15 + Tween 80 al 0.01%
<b>T3</b>	Sustrato	Cepa Y15
<b>T4</b>	Sustrato	Cepa Y15 + Tween 80 al 0.01%
<b>T5</b>	Follaje y sustrato	Agua estéril
<b>T6</b>	Follaje y sustrato	Tween 80 al 0.01%

24 y 48 horas después de la inoculación de la bacteria en cada tratamiento, se hicieron los reisolamientos de la cepa Y15 de *B. thuringiensis* como endófito de raíz, tallo y hoja, posteriormente los reisolamientos se hicieron cada semana. Los perfiles proteicos de las bacterias aisladas se compararon con el perfil de la cepa Y15 de *B. thuringiensis* inoculada.

#### **6.3.5. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de *B. thuringiensis* en caña de azúcar en condiciones de invernadero**

Para evaluar la actividad promotora de crecimiento, se utilizaron los mismos tratamientos del apartado 6.3.3.

Se midió la altura de todas las plantas y se obtuvo el peso seco después de 60 días. Para obtener el peso seco, se retiraron las plantas de las macetas, se lavaron con abundante agua corriente para retirar toda la tierra, y se dejó

durante 24 horas en el horno a una temperatura de 60°C, finalmente las muestras se pesaron en una balanza granataria.

### 6.3.6. Evaluación de la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* en hojas de caña de azúcar

Para evaluar la actividad insecticida de *B. thuringiensis*, cepa Y15 se inoculó una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml solos o en combinación con tween 80 en plantas de caña de azúcar; los tratamientos a evaluar se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos para la evaluación de la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* en hojas de caña de azúcar.

Tratamiento	Aplicación en:	Solución bacteriana ( $1 \times 10^8$ células/ml)
T1	Follaje	Cepa Y15
T2	Follaje	Cepa Y15 + Tween 80 al 0.01%
T3	Sustrato	Cepa Y15
T4	Sustrato	Cepa Y15 + Tween 80 al 0.01%
T5	Follaje y sustrato	Agua estéril
T6	Follaje y sustrato	Tween 80 al 0.01%

Después de siete días post inoculación, se tomaron hojas de caña de azúcar de cada tratamiento y se cortaron fragmentos de 1.5 x 2 cm, se realizó una desinfección superficial y cada fragmento de hoja se colocó en una caja Petri con agar-agar para mantener la humedad, también se colocó en cada hoja una larva neonata de *S. frugiperda*. Se realizó un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y tres repeticiones cada uno. El bioensayo tuvo una duración de siete días.

### 6.3.7. Análisis estadísticos

Para transformar los valores de las variables de porcentaje de mortalidad se hizo una transformación angular (arcos), una vez transformados los datos

se realizó un análisis de varianza y comparación múltiple de medias Tukey o diferencia mínima significativa (DMS) a un nivel de significancia de 0.05, se utilizó el paquete estadístico SAS 9.1.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Transformación de *B. thuringiensis* con el plásmido pMutin-GFP<sup>+</sup>

Con el fin de poder visualizar y rastrear la cepa Y15 de *B. thuringiensis* se realizó la transformación con el plásmido pMutin-GFP<sup>+</sup>. Después del proceso de electroporación, las células vegetativas de la cepa Y15 mostraron la expresión de la proteína verde fluorescente. En la Figura 3 se observan las células fluorescentes de la cepa Y15 en microscopio de epi-fluorescencia vistas a 100x.

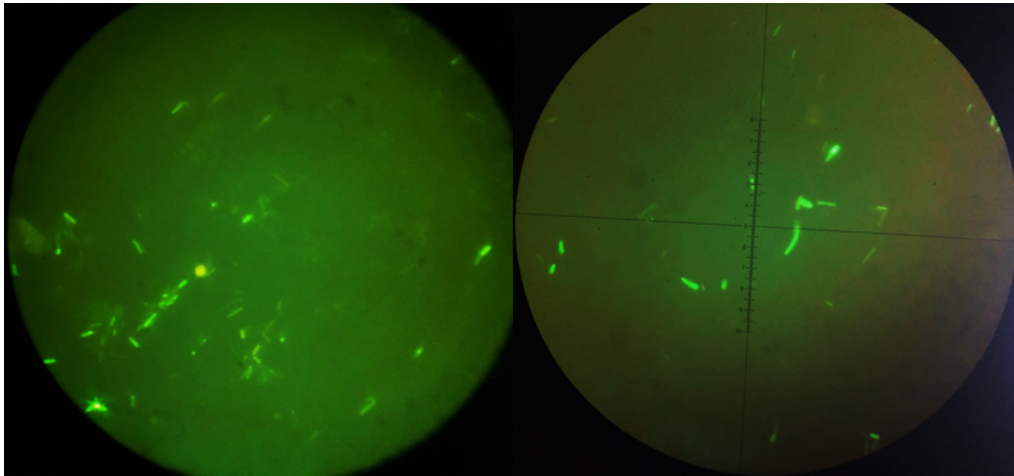


Figura 3. Células de cepa Y15 de *B. thuringiensis* en microscopio de fluorescencia a 100x

Las colonias transformadas fueron seleccionadas en medio de cultivo LB con eritromicina (30 ng/mL), se esperó 48 horas para ver crecimiento de colonias únicas, sin embargo, no todas las colonias mostraron fluorescencia al ser expuestas a luz azul, únicamente 1 colonia de 10 fue la que expuso la proteína GFP. Para comprobar que las células realmente tenían el plásmido pMutin-GFP<sup>+</sup> se hizo una extracción de DNA plasmídico, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%, en la figura 4 se muestra el gel de

agarosa donde se puede observar que el pMutin-GFP<sup>+</sup> aislado de la cepa Y15 transformada tiene un número de pares de bases y patrón electroforético similar al plásmido empleado en la transformación.

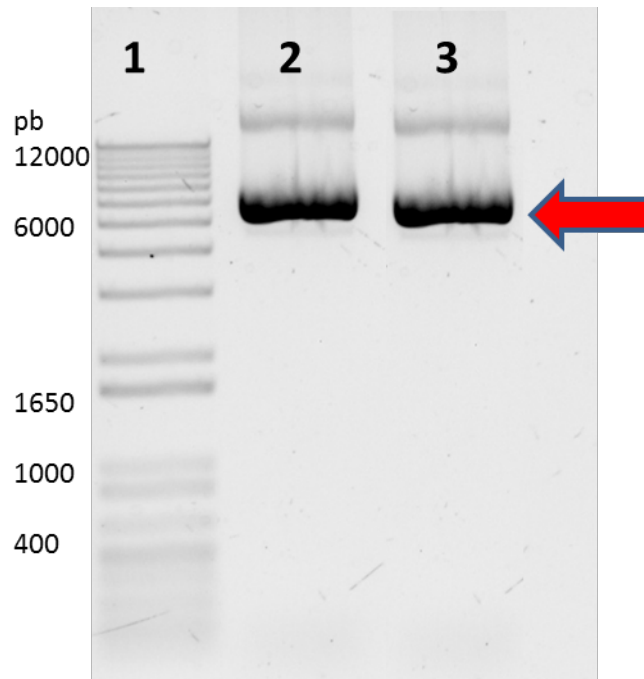


Figura 4. Electroforesis del plásmido pMutin-GFP<sup>+</sup> en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Plásmido pMUTIN- GFP<sup>+</sup>. Carril 3: pMUTIN- GFP<sup>+</sup> aislado de la cepa Y15 transformada

## 7.2. Evaluación de la actividad endófitra de *B. thuringiensis* en plántulas de maíz bajo condiciones controladas

Una vez inoculadas las plántulas de maíz, se dejaron pasar 7 días para hacer los reisolamientos de la cepa Y15::GFP de *B. thuringiensis* en medio LB con antibiótico; en la figura 5 se observa el crecimiento de bacterias con una morfología muy parecida a la de la cepa Y15::GFP.



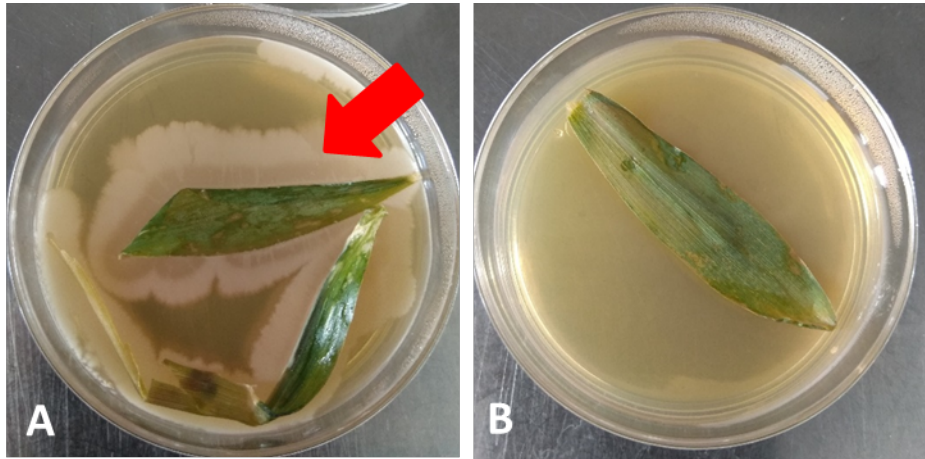


Figura 5. Reaislamiento de la cepa Y15::GFP en medio LB con antibiótico. A) Hojas de plántulas de maíz inoculadas con la cepa Y15::GFP. B) Hoja de plántulas de maíz inoculados con agua

Después de reaislar las bacterias endófitas, se compararon los perfiles proteicos de *B. thuringiensis*, donde se mostraron características similares entre las cepas Y15::GFP y las bacterias reaisladas de los tejidos de plántulas maíz (figura 6). En el gel de poliacrilamida se observa un patrón de bandas diferentes entre la cepa HD73::GFP y Y15::GFP, en ambos perfiles (carriles 2 y 3) se presenta una banda cercana a los 27 kDa, que corresponden al peso estimado de la proteína GFP presente en ambas cepas y ausente en la cepa control Y15 (carril 10). Lo anterior confirma la identidad, de las bacterias endófitas aisladas de las plantas germinadas de semillas inoculadas o crecidas en sustrato inoculado con la cepa Y15::GFP.

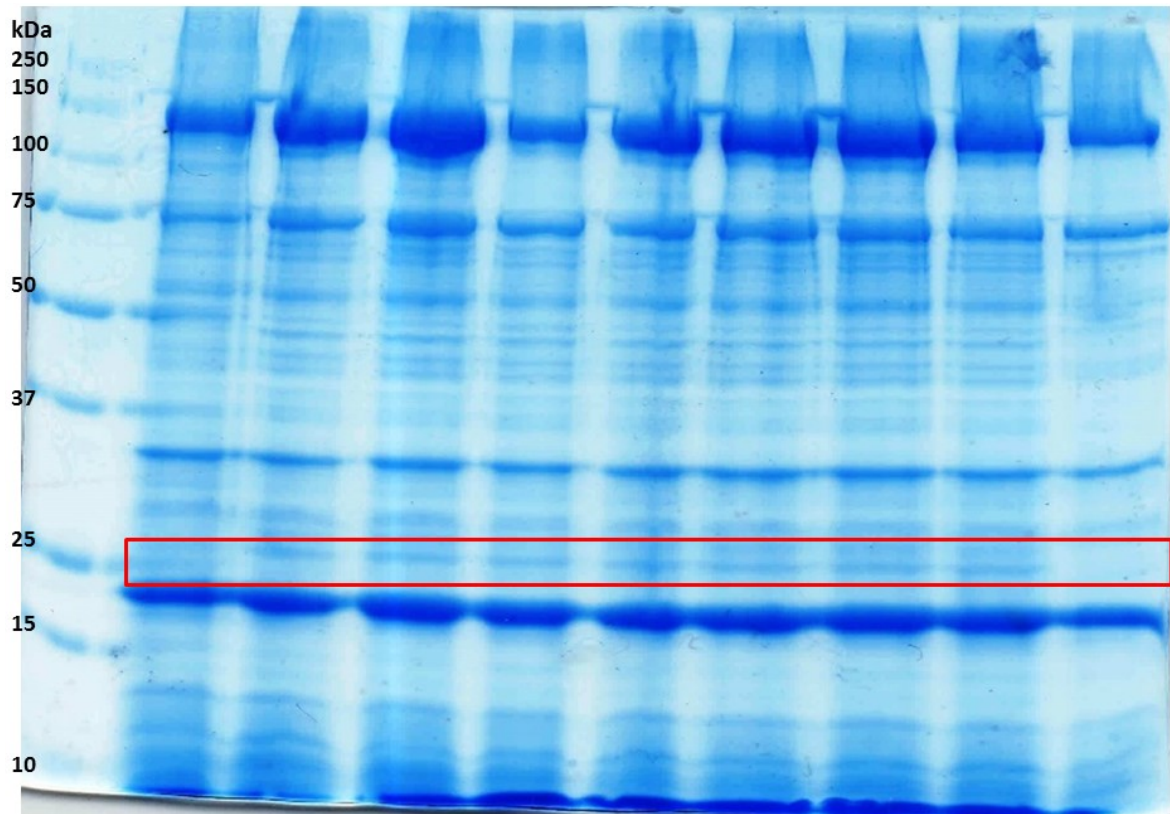


Figura 6. Perfil proteico (SDS-PAGE 12%) de bacterias aisladas de las plantas de maíz inoculadas con la cepa Y15::GFP de *B. thuringiensis*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: cepa HD73::GFP. Carriles 3: Cepa Y15::GFP control. Carril 4 y 5: Bacterias aisladas del tratamiento 1, (Semillas sumergidas en solución de Bt). Carril 6-9: Bacterias aisladas de raíz del tratamiento 4 (Bt aplicado en sustrato). Carril 10: Cepa Y15 silvestre

Por otra parte, al realizar los cortes de las plantas de maíz y observar al microscopio, se pudieron identificar células fluorescentes en los tejidos de hoja, tallo y raíz (Figura 7, 8 y 9 respectivamente).

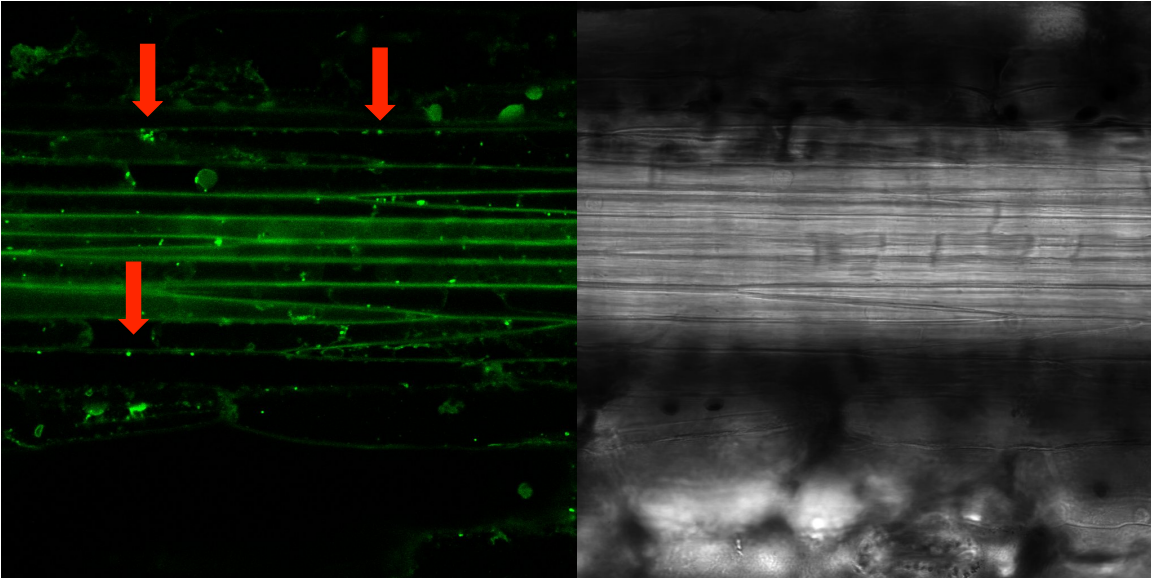


Figura 7. Micrografía confocal (Olympus FV1000, lente 60x) de la cepa Y15::GFP en un corte longitudinal de peciolo de maíz (panel izquierdo). Las bacterias se observan en el interior del tejido (flechas). También se observa autofluorescencia de los haces vasculares. El material fue excitado con láser de 633 nm. En el panel de la derecha se presenta el mismo corte longitudinal observado con luz blanca.

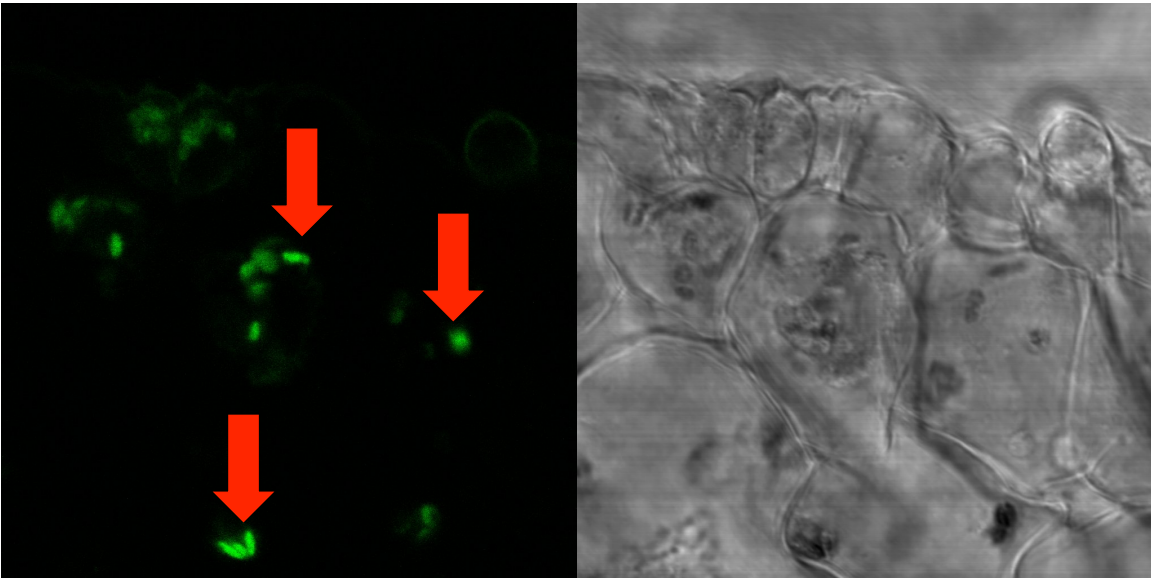


Figura 8. Micrografía confocal (Olympus FV1000, lente 60x) de la cepa Y15::GFP en un corte transversal de tallo de maíz (panel izquierdo). Las bacterias se observan en el interior del tejido (flechas). También se observa autofluorescencia de los haces vasculares. El material fue excitado con laser de 633 nm. En el panel de la derecha se presenta el mismo corte longitudinal observado con luz blanca.

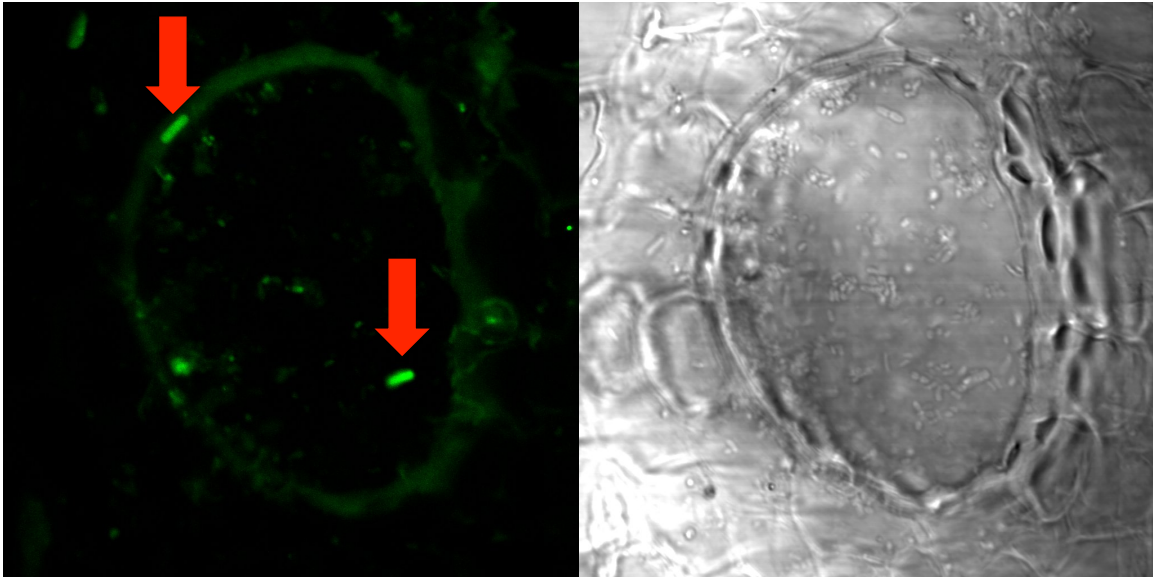


Figura 9. Micrografía confocal (Olympus FV1000, lente 60x) de la cepa Y15::GFP en un corte transversal de raíz de plantas de maíz (panel izquierdo). Las bacterias se observan en el interior del tejido (flechas). También se observa autofluorescencia de los haces vasculares. El material fue excitado con laser de 633 nm. En el panel de la derecha se presenta el mismo corte transversal observado con luz blanca.

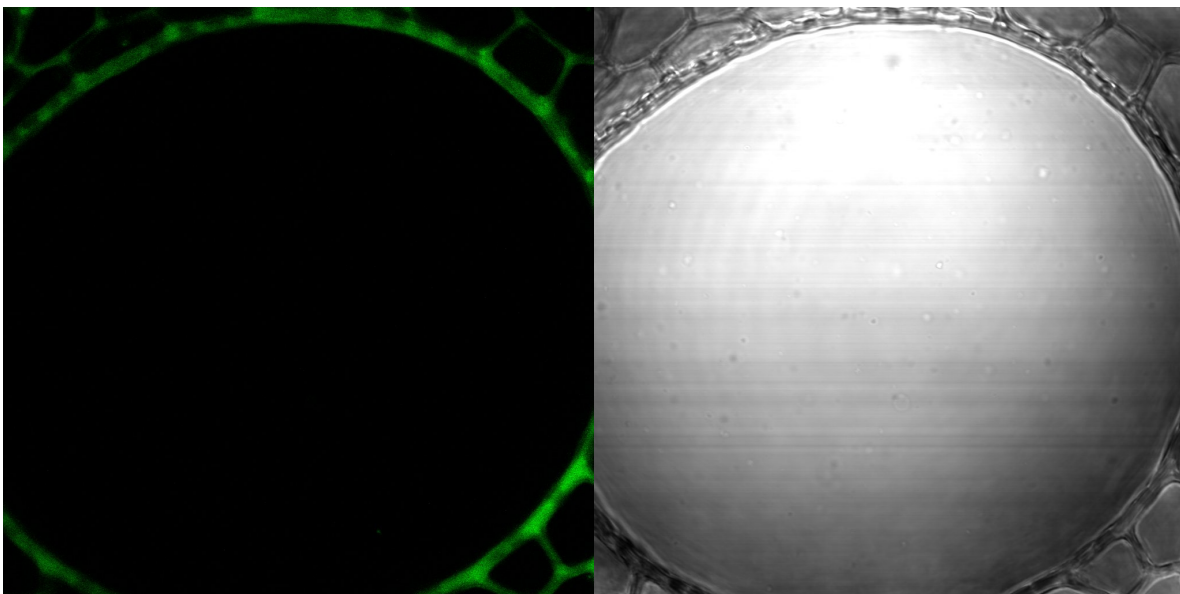


Figura 10. Micrografía confocal (Olympus FV1000, lente 60x) en un corte transversal de tallo de plantas de maíz de un tratamiento control, donde no se inocularon bacterias (panel izquierdo). El material fue excitado con laser de 633 nm. En el panel de la derecha se presenta el mismo corte longitudinal observado con luz blanca. No se observan bacterias fluorescentes.

#### **7.1.1. Evaluación de la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* cepa Y15 en plantas de maíz en condiciones controladas**

La cepa Y15 de *B. thuringiensis*, inoculadas en plantas de maíz no es tóxica en larvas de tercer instar de *S. frugiperda*. Todas las larvas se mantuvieron en buen estado y consumieron el follaje de la planta de manera normal. Tampoco hubo una diferencia estadísticamente significativa en los pesos de las larvas, en los tratamientos todas presentaron pesos muy parecidos 2 semanas después del ensayo. Sin embargo es importante resaltar que se lograron reaislar bacterias endófitas de los tratamientos con morfología parecida a *B. thuringiensis*, excepto en el control.

#### **7.2.1. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de *B. thuringiensis* en maíz en condiciones de invernadero**

Las plántulas de maíz fueron expuestas a 6 tratamientos para conocer la condición mas idónea para inocular las bacterias y obtener mayores beneficios de las células de *B. thuringiensis* Cepa Y15. Los resultados de altura y peso seco se presentan en las Figura 11 y 12 respectivamente.

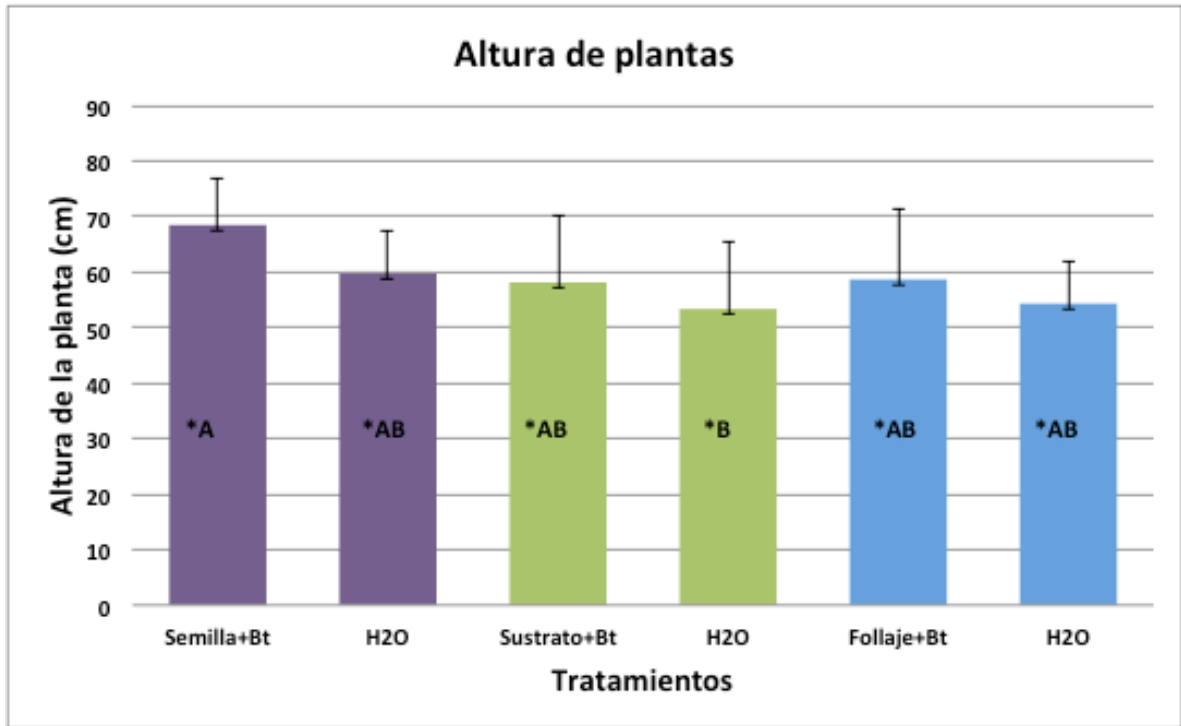


Figura 11. Gráfica de Altura de plantas de maíz. La gráfica de barras presenta los promedios de las medias  $\pm$  SD de la altura de las plantas inoculadas con  $1 \times 10^8$  células/ml sobre el follaje, sustrato o semilla.  $n=30$ ,  $p>0.05$ ; Las barras en morado representan la aplicación en semilla, las barras en verde representan la aplicación en sustrato, y las barras azules representan la aplicación en follaje. Se puede observar que el tratamiento que presentó una mayor altura fue la aplicación de *B. thuringiensis* en semilla, mientras que el tratamiento con menor altura fue la aplicación de *B. thuringiensis* en sustrato. \*Letras iguales no tiene diferencia estadísticamente significativa.

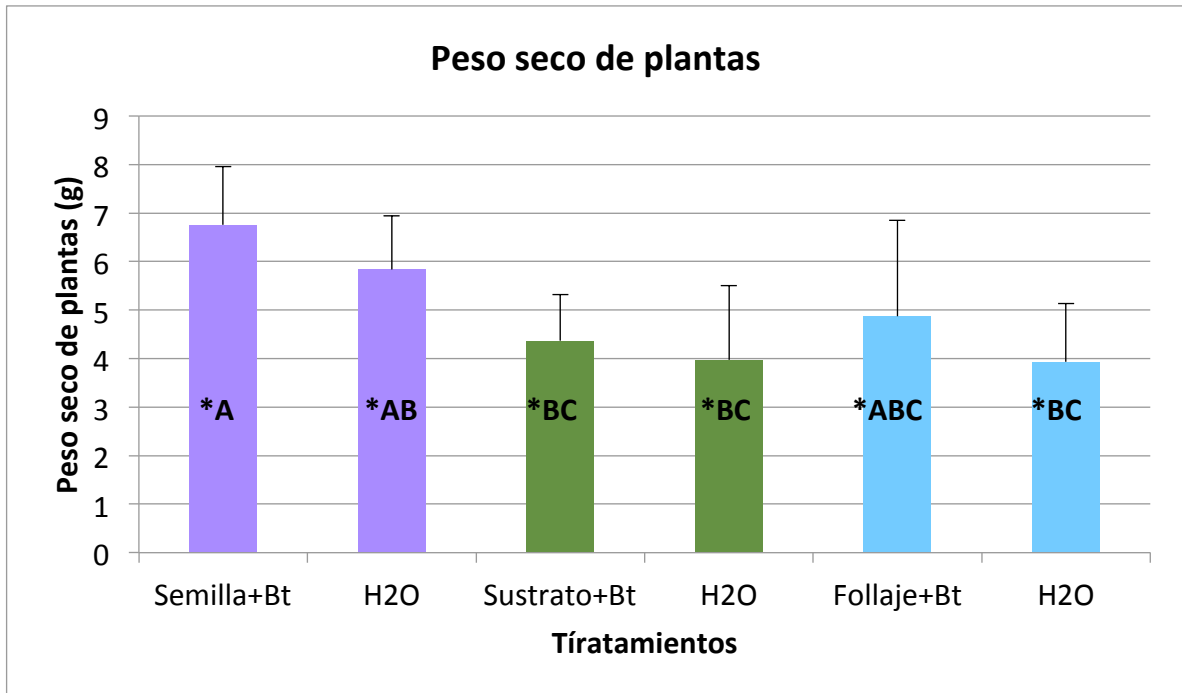


Figura 12. Gráfica del peso seco de plantas de maíz. Gráfica de barras de los promedios de las medias  $\pm$  SD de la altura de las plantas inoculadas con  $1 \times 10^8$  células/ml sobre el follaje, sustrato o semilla.  $n=30$ ,  $p>0.05$ ; Las barras en morado representan la aplicación en semilla, las barras en verde representan la aplicación en sustrato, y las barras azules representan la aplicación en follaje. El tratamiento donde se obtuvo el mayor peso seco fue la aplicación de *B. thuringiensis* en semilla, mientras que se obtuvo un menor peso seco del tratamiento donde se aplicó *B. thuringiensis* en sustrato. \*Letras iguales no tiene diferencia estadísticamente significativa.

### 7.2.2. Evaluación de la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* en hojas de maíz.

Se evaluó la actividad insecticida de la cepa Y15::GFP endófito contra *S. frugiperda* durante 7 días de exposición. En la figura 9 se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de mortalidad entre cada tratamiento. Todos los tratamientos con la cepa Y15::GFP fueron efectivos para controlar a *S. frugiperda*, el valor máximo de mortalidad observada es 40% en larvas alimentadas con hojas de plantas de maíz crecidas en sustrato inoculado con la bacteria. La concentración de tween empleada no tienen efecto sobre la mortalidad de las larvas.

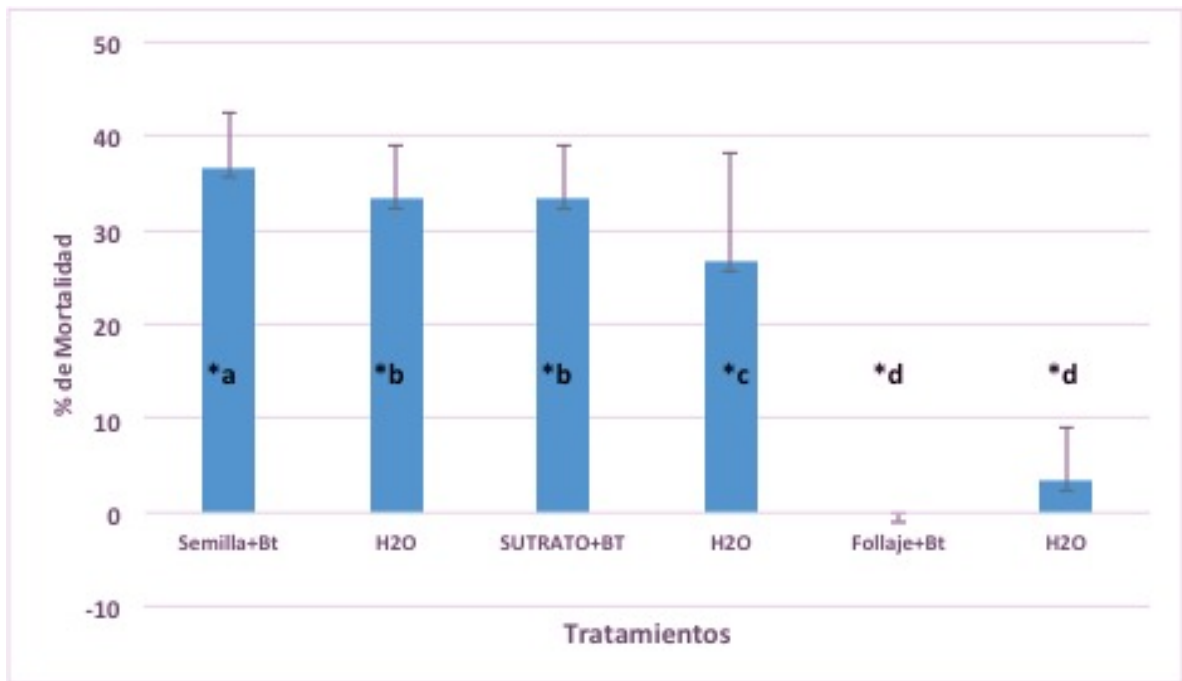


Figura 13. Mortalidad de *S. frugiperda* al día 7 post tratamiento con la cepa Y-15::GFP. Valores estadísticos promedio  $\pm$  desviación estándar, análisis estadístico Tukey-Kramer (letras diferentes indican diferencia estadística).

### 7.1.2. Evaluación de la actividad endófitra de *B. thuringiensis* en caña de azúcar en condiciones de invernadero

Después de la inoculación de la cepa Y15 silvestre de *B. thuringiensis* en plántulas de caña de azúcar, se logró reaislar la bacteria a partir de las 24 horas post aplicación, y hasta 6 semanas posterior al suministro de *B. thuringiensis* en las plántulas. En la Figura 14 se muestra el crecimiento del microorganismo en medio LB, los controles de agua y tween 80 no presentaron crecimiento de la bacteria.



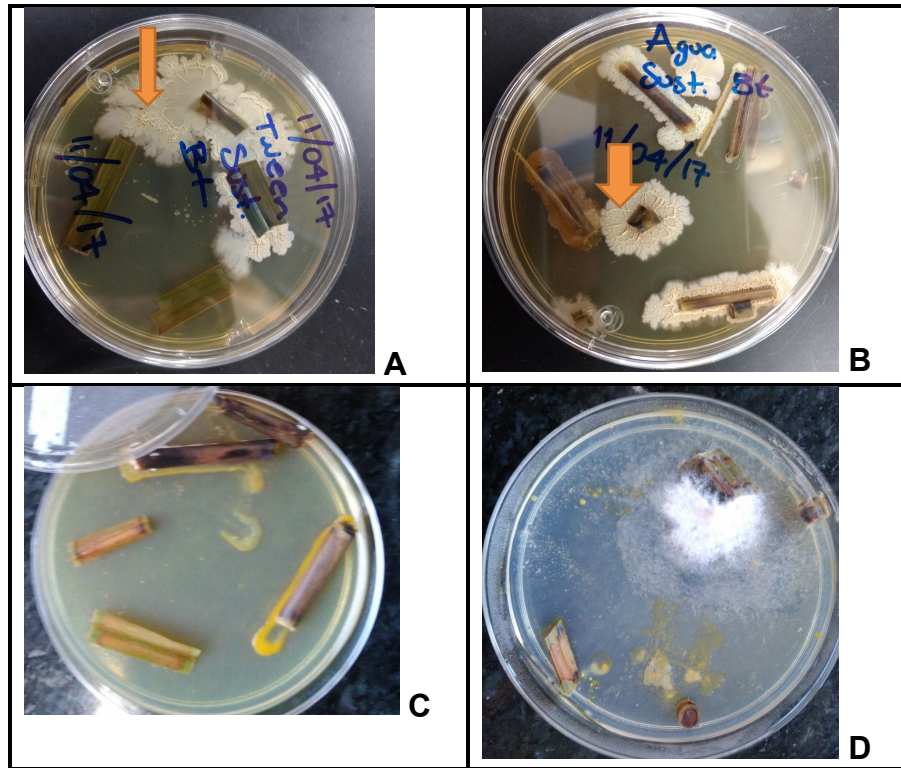


Figura 14. Aislamiento de la cepa Y15 endófito. A y B: Cajas Petri con tallos y hojas de caña de azúcar inoculadas con *B. thuringiensis* que presentan el posible crecimiento de la cepa Y15 como endófito señalada con una flecha roja. C: Cajas Petri con tallos y hojas de caña de azúcar control, inoculadas únicamente con tween, se observa el crecimiento de una bacteria amarilla. D: Cajas Petri con tallos y hojas de caña de azúcar control, inoculadas únicamente con agua, se observa el crecimiento de hongos de coloración blanca y una bacteria de coloración amarilla.

Los perfiles mostraron gran similitud entre la cepa Y15 y las bacterias aisladas como endófitas de plantas de caña de azúcar. En la figura 15, se puede apreciar en todos los perfiles bandas mayoritarias con un peso aproximado de 150 kDa.

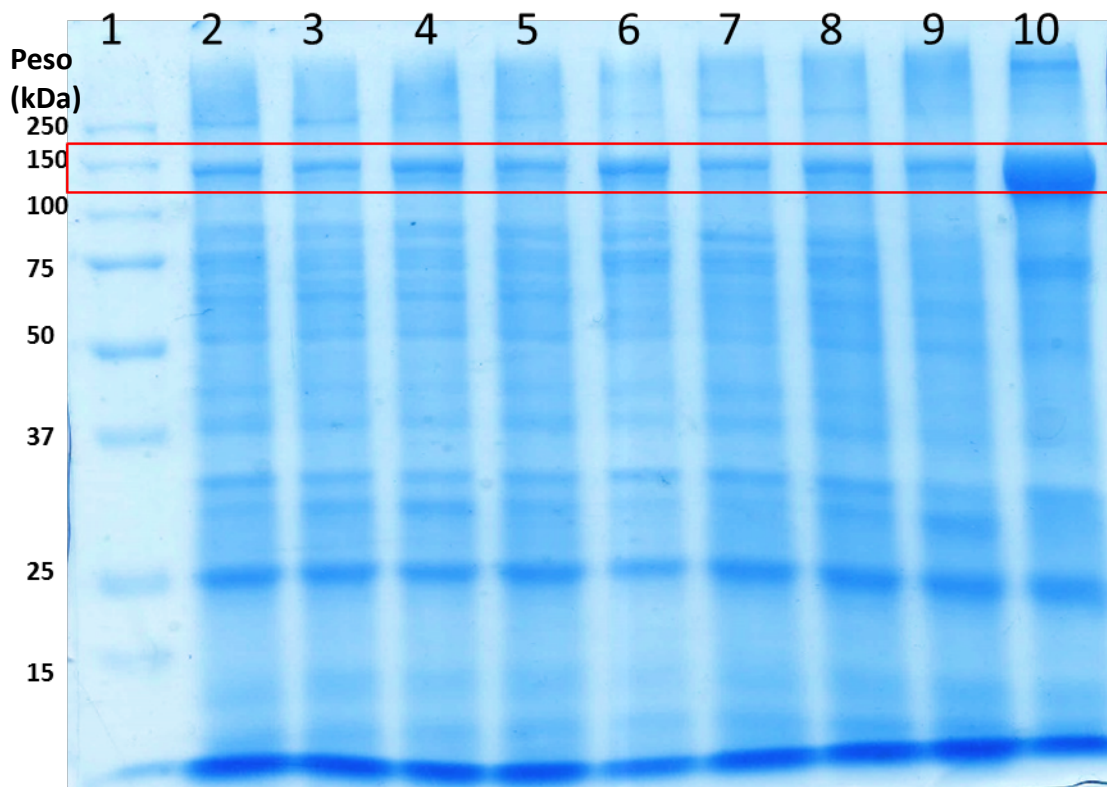


Figura 15. Perfil proteico de bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de plantas inoculadas con la cepa Y15 (SDS-PAGE 10%). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Cepa Y15. Carril 3: aislado de raíz del tratamiento 1. Carril 4: aislado de tallo del tratamiento 1. Carril 5: aislado de hoja del tratamiento 2. Carril 6: aislado de tallo del tratamiento 2. Carril 7: Bacteria aislado de hoja del tratamiento 3. Carril 8: aislado de raíz del tratamiento 3. Carril 9: aislado de hoja del tratamiento 4. Carril 10: aislado de tallo del tratamiento 4

También se calculó el porcentaje de reaislamiento con respecto al tiempo como se muestra en la Figura 16. Cuando se aplica *B. thuringiensis* en sustrato, la bacteria tarda 48 horas en establecerse como endófito en al menos 35% de las plantas de caña de azúcar, en contraste, los tratamientos donde se aplicaba *B. thuringiensis* en follaje, el establecimiento de *B. thuringiensis* como endófito ocurre en al menos 24 horas en cerca del 60% de las plantas. A partir de la segunda semana se logró reaislar a *B. thuringiensis* del 100% de las plántulas de caña de azúcar, y el porcentaje de reaislamiento permaneció constante durante 6 semanas. En los tratamientos control no se encontró ningún aislamiento bacteriano con morfología parecida a la de *B. thuringiensis*.

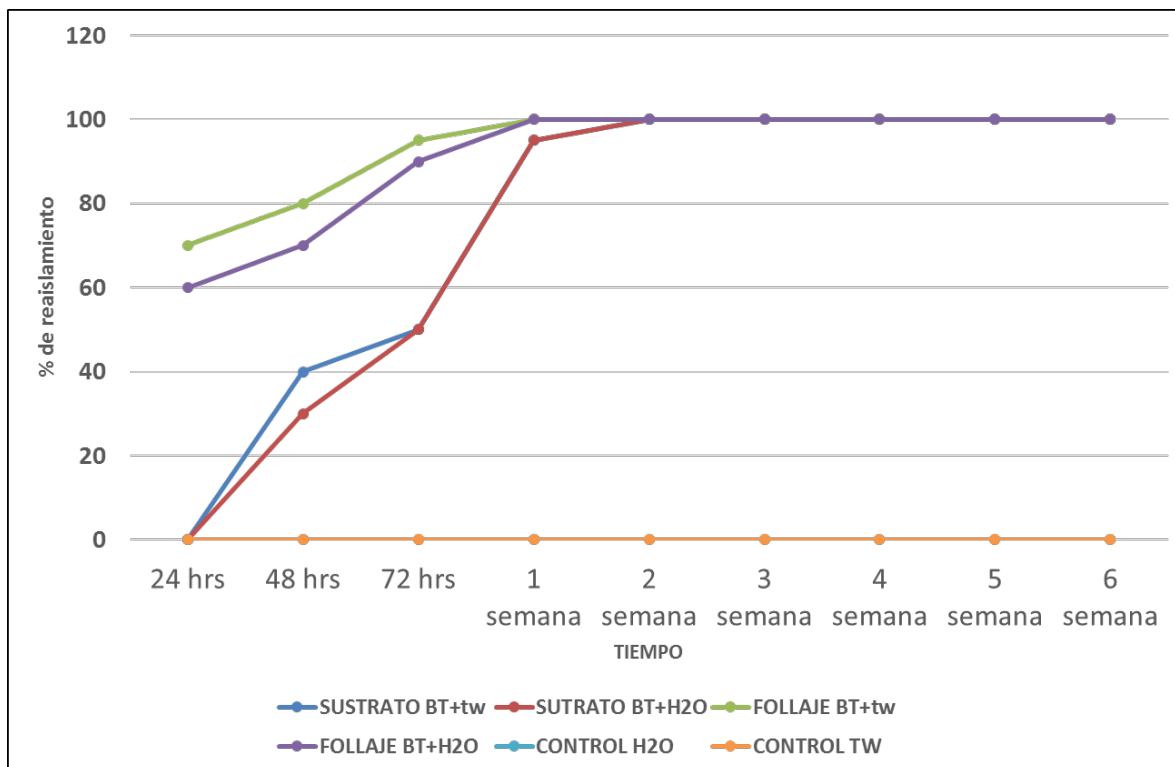


Figura 16. Porcentaje de reaslamiento de *B. thuringiensis* durante 6 semanas en caña de azúcar. Porcentajes con base a 3 repeticiones por tratamiento. BT: *B. thuringiensis*. TW: Tween 80.

### 7.1.3. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de *B. thuringiensis* en caña de azúcar en condiciones de invernadero

Las plántulas de caña de azúcar fueron expuestas a 6 tratamientos para conocer el efecto de células vegetativas de *B. thuringiensis* en la altura y peso seco de la planta (Figura 17 y 18).

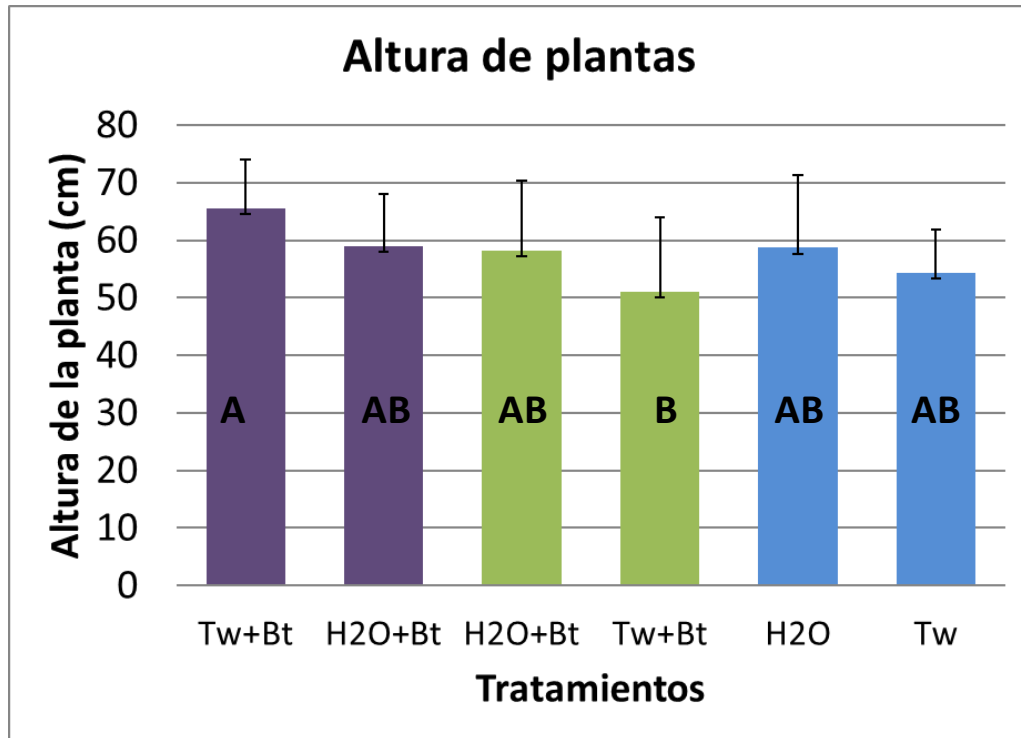


Figura 17. Efecto de *B. thuringiensis* en la altura de las plantas de caña de azúcar. La gráfica de barras presenta los promedios de las medias  $\pm$  SD de la altura de las plantas inoculadas con  $1 \times 10^7$  células de en agua o tween sobre el follaje o sustrato.  $n=30$ ,  $p>0.05$ ; Las barras en morado representan la aplicación en follaje, las barras en verde representan la aplicación en sustrato, y las barras azules representan la aplicación en follaje y sustrato. \*Letras iguales no tiene diferencia estadísticamente significativa. BT: *B. thuringiensis*. TW: Tween 80.

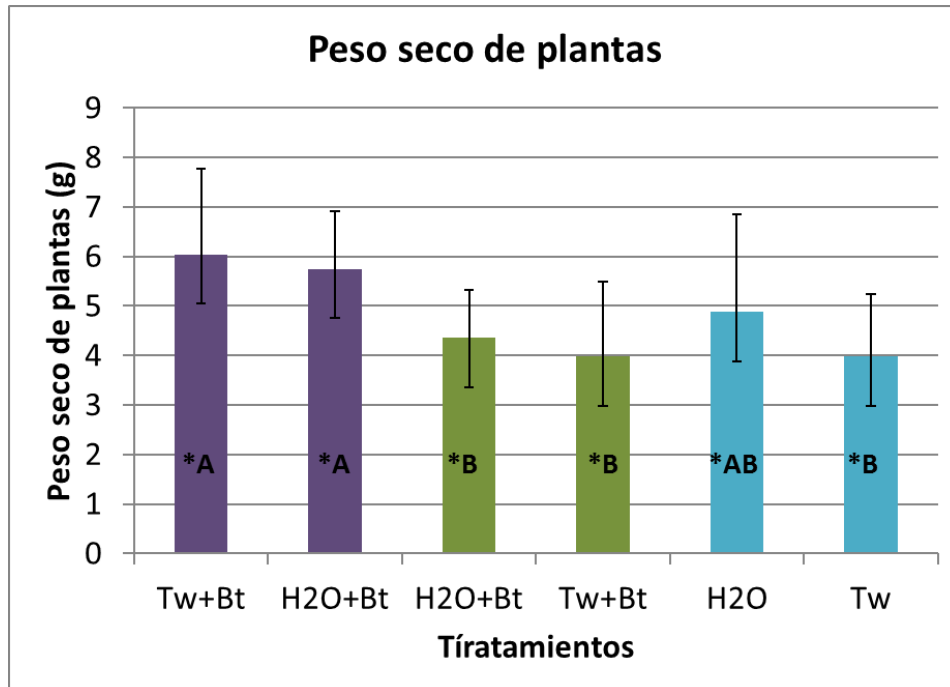


Figura 18. Gráfica de barras de los promedios de las medias  $\pm$  SD del peso seco de las plantas inoculadas con  $1 \times 10^7$  células de *B. thuringiensis* en agua o tween sobre el follaje o sustrato.  $n=30$ ,  $p>0.05$ ; Las barras en morado representan la aplicación en follaje, las barras en verde representan la aplicación en sustrato, y las barras azules representan la aplicación en follaje y sustrato. \*Letras iguales no tiene diferencia estadísticamente significativa. BT: *B. thuringiensis*. TW: Tween 80

La máxima altura alcanzada por las plantas se observó en el tratamiento 1 (tween + Bt en follaje), las plantas alcanzaron entre 60 y 94 cm de altura, en general presentaban una buena apariencia, tenían una coloración verde intenso, y todas se mantuvieron así durante más de 60 días. Por otro lado, los tratamientos 2, 3, 5, y 6 no presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, y la altura, así como la apariencia de las plantas, difiere en comparación al tratamiento 1. El tratamiento 3 mostró alturas menores y una apariencia débil, con hojas de color verde claro; seguido del tratamiento 6 (control de tween), el cual presentó alturas menores y apariencia menos vigorosa en comparación con el tratamiento 1. Por último, el tratamiento 4, en el cual la mitad de las plántulas murieron a los 60 días.

Por otra parte, también se obtuvieron los pesos secos de las plantas de caña de azúcar, el análisis estadístico arrojó los resultados que se

presentan en la Figura 18, el tratamiento 1 y 2 mostraron los mejores resultados y no se tiene una diferencia estadísticamente significativa entre ambos, sin embargo, si existe una diferencia significativa entre los tratamientos donde se aplicó *B. thuringiensis* en sustrato y follaje.

#### 7.1.4. Evaluación de la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* en hojas de caña de azúcar

Se evaluó la mortalidad de *B. thuringiensis* como endófito en hojas de caña de azúcar, en donde se encontró que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre cada tratamiento, en la figura 19 se muestran los resultados de los bioensayos, la mortalidad es de 30% aproximadamente.

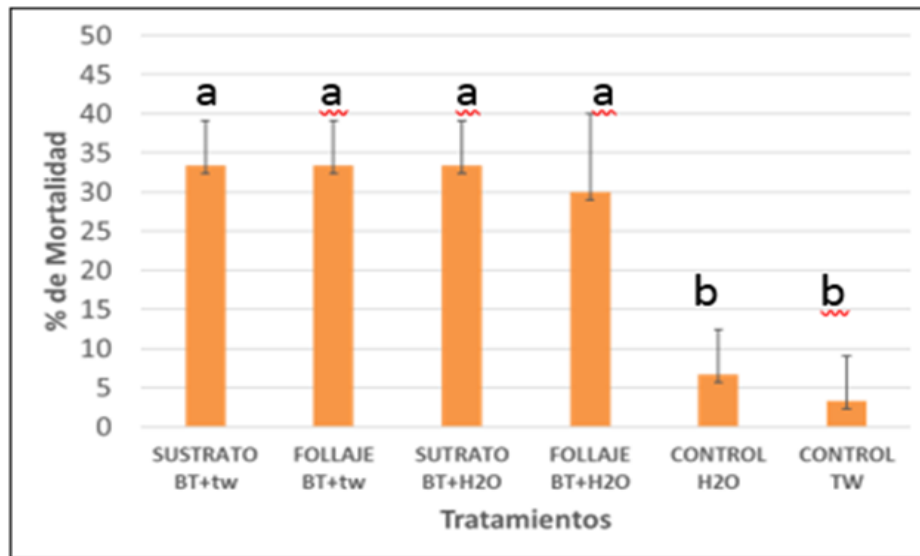


Figura 19. Mortalidad de *S. frugiperda* al día 7 post tratamiento con la cepa Y-15::GFP. Valores estadísticos promedio  $\pm$  desviación estándar, análisis estadístico Tukey-Kramer, (letras diferentes indican diferencia estadística). BT: *B. thuringiensis*. TW: Tween 80

## 8. DISCUSIÓN

Se lograron reaislar bacterias de diferentes tejidos de caña de azúcar y

maíz con características morfológicas muy parecidas a las de la cepa Y15 de *B. thuringiensis*, además, el perfil proteico de las bacterias reaisladas tanto en caña de azúcar como en maíz, mostraron que los pesos y número de bandas de las proteínas son muy parecidos al control, lo cual puede darnos un indicio del comportamiento endófito de la cepa Y15 tiene un comportamiento endófito. Otro punto importante a mencionar, es que, el perfil proteico de las bacterias aisladas en plantas de maíz tienen una banda de aproximadamente 27 kDa, lo que representa el peso de la proteína verde fluorescente, recordemos que en el experimento de maíz en condiciones controladas, se utilizó la cepa Y15 transformante, esto nos da otra señal de que las bacterias que se aislaron provienen de la cepa Y15::GFP que fue inoculada en las plántulas, sin olvidar la similitud de la banda mayoritaria con un peso molecular de 150 kDa correspondiente a la proteína del cristal de la cepa Y15. Además, estas bacterias fueron aisladas de todos los tejidos de las plantas, lo cual nos indica que la bacteria tiene la capacidad de traslocarse de un tejido a otro, y colonizar todos los tejidos de su hospedero, estos resultados concuerdan con los de García *et al.*, 2017, donde se observa una cepa de *B. thuringiensis* como endófito en *A. thaliana*, con capacidad de traslocarse desde la rizosfera, hasta las partes aéreas de la planta como hojas y flores, y además, permanecer en las semillas hasta después de la germinación.

Por otra parte, la aplicación de la cepa Y15 de *B. thuringiensis* sobre el follaje, contribuye al crecimiento de la planta, si bien no hay una diferencia estadísticamente significativa, se pueden observar una mayor altura y peso seco en las plantas, como se presenta en las figuras 11, 12, 17 y 18, este tratamiento en comparación con el control, presentó un aumento en altura y peso seco de la plántula tanto en maíz como en caña de azúcar, además de una mejor apariencia; se sabe que los microorganismos endófitos, sobre todo del género *Bacillus*, en algunas ocasiones, tienen actividad promotora de crecimiento (Dimkpa *et al.*, 2009) mediante la producción de hormonas

reguladoras de crecimiento como ácido indolacético, giberelinas o citocininas, sideroforos, compuestos volátiles, o bien, solubilizando fosfato y fijando nitrógeno, de esta manera aumentan el peso y altura de las plantas (Lopes *et al.*, 2008), en 2015 Yaish *et al.*, reporta una cepa de *B. thuringiensis* con actividad endófito y promotora de crecimiento, aislada de raíces de palma, esta cepa producía auxinas que promovían el crecimiento de la planta y le proporcionaban, además, tolerancia a suelos con altas concentraciones salinas; Vidal *et al.*, (2013) reporta la actividad endófito y promotora de crecimiento de *B. thuringiensis* en *A. thaliana*, donde se observó un mayor crecimiento de las raíces al inocular *B. thuringiensis* en semillas. También se tienen reportes con plantas de maíz, donde se observó un aumento de la altura y peso del maíz al ser inoculado con bacterias del género *Bacillus*, se determinó que la bacteria tenía la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles que afectaban de manera positiva a la planta (Rath *et al.*, 2018). Sin bien estos reportes concuerdan con los resultados que arroja el presente trabajo, aún se desconoce el mecanismo por el cual la cepa Y15 de *B. thuringiensis* puede promover el crecimiento de las plantas.

Por otro lado, el tratamiento que presentó una menor altura y peso de la plántula de caña de azúcar, fue el tratamiento 4, en donde se aplicó *B. thuringiensis* y tween 80 en el sustrato, en este tratamiento se observó un cambio en la apariencia de las plántulas, las hojas comenzaban a perder coloración y después de 6 semanas alrededor del 50% de las plántulas llegaron a morir; probablemente se debe al estrés que produjo la aplicación del Tween 80 y la bacteria al ser aplicados directamente al sustrato, lo que pudo afectar a las raíces de la planta; los reportes indican que algunos surfactantes como el Tween reprimen el crecimiento de la raíz, evitan la germinación de las semillas o bien, permite que microorganismos patógenos tengan una mayor facilidad para entrar a la raíz de la planta, sobre todo a una edad temprana de la plántula, todos estos factores producen un estrés, que podría ser la razón de los efectos negativos en el



tratamiento 4 de la caña de azúcar y en maíz (Buchanan, 1965).

También se observó que, en el transcurso de 2 semanas, la bacteria se logra traslocar y establecer como endófito en el 100% de las plántulas y permanecer constante al menos durante 6 semanas (Figura 16), estos resultados se relacionan con Gomes *et al.*, 2009, quienes reportan por primera vez la capacidad de *B. thuringiensis* de emigrar de la raíz a las hojas por medio del xilema; también se pudo ver que la bacteria tiene una mayor facilidad para establecerse como endófito si se aplica en el follaje, muy probablemente por la facilidad de entrar a la planta por medio de los estomas y heridas que tienen las hojas (Compant *et al.*, 2010; Haridoim *et al.*, 2015). Por otra parte, la gráfica muestra que, si la aplicación es en el sustrato, la bacteria tarda más en establecerse como endófito, probablemente porque al no estar en contacto directo con su hospedero, tendría que buscar primero algún tejido para colonizar, lo cual retrasa su entrada a la planta; esto es una posibilidad de acuerdo a lo reportado por García *et al.*, en 2017, donde menciona que las células vegetativas de *B. thuringiensis* pueden internalizarse a su hospedero por medio de la producción de enzimas que logran degradar los tejidos de la raíz, y con esto, poder entrar y colonizar el resto de la planta, y en el caso de las esporas, se pueden internalizar por aberturas naturales o heridas de la planta.

También se evaluó la mortalidad sobre *S. frugiperda* en hojas caña de azúcar y maíz, en ambos casos se observa una mortalidad del 30% de larvas neonatas de *S. frugiperda*, posiblemente porque *B. thuringiensis* ya está establecido como endófito en todos los tratamientos donde fue inoculado, por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa en la mortalidad. Estos resultados de mortalidad semejan a los de Gomes *et al.*, 2009, donde obtuvo mortalidades del 10% en *P. xilostela* y 25% en *S. frugiperda*, usando algodón y col respectivamente, como hospederos de la bacteria. García *et al.*, 2017, reporta mortalidades de hasta el 45% sobre

*Trichoplusia ni* en plantas de frijol. Estos resultados nos demuestran que la mortalidad de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *S. frugiperda* disminuye al estar dentro de la planta, probablemente debido a que la cantidad de cristales no sea tan elevada como para ser lo suficientemente tóxica, en comparación con los bioensayos en dietas merídicas, además, las condiciones en las que se encuentran no están controladas, lo que puede dar variaciones en la mortalidad de las larvas. Por otra parte, en los bioensayos realizados en frascos de vidrio con plántulas de maíz y larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*, no presentaron mortalidad, lo que muy posiblemente se deba a la edad de las larvas, Frankenhuyzen *et al.*, (2010) reporta que la edad y la carga de microorganismos en el intestino medio del insecto influyen mucho en la toxicidad de *B. thuringiensis*, de manera que en los últimos estadios de la larva, la mortalidad disminuye, por lo que en este experimento, al usar larvas de tercer instar, los porcentajes de mortalidad fueron nulos.

El presente trabajo demuestra que *B. thuringiensis* tiene potencial para su uso en campo, no únicamente con el fin de controlar plagas, sino también, para obtener mejores rendimientos de los cultivos, debido a su actividad promotora de crecimiento, sin embargo, se tendría que estudiar el comportamiento de esta bacteria en campo, posiblemente las condiciones ambientales como temperatura, pH, humedad, y la interacción con otros microorganismos modifiquen el comportamiento de la bacteria.

## 9. CONCLUSIONES

- La cepa Y15 de *B. thuringiensis* puede establecerse como endófito y traslocarse a diferentes tejidos de las plantas de caña de azúcar y maíz.
- La aplicación en follaje de la cepa Y15 de *B. thuringiensis* favorece el crecimiento de las plántulas de caña de azúcar, ya que presentaron

los valores máximos de altura y peso seco respecto a los demás tratamientos.

- La cepa Y15 de *B. thuringiensis* tiene actividad entomopatógena como endófito en hojas de caña de azúcar sobre larvas de *S. frugiperda*.

## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad endófito y entomopatógena de la cepa Y15 de *B. thuringiensis* en caña de azúcar y maíz en campo.
- Determinar el rango de hospederos y especificidad de la cepa Y15.
- Evaluar el efecto de la cepa Y15 como insecticida y promotor de crecimiento en otras especies de plantas.
- Determinar los mecanismos de estimulación de la cepa Y15 como promotora del crecimiento vegetal.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aragón, J. 2002. Plagas del maíz y su control integrado. Guia Dekalb del cultivo de Maíz. 117-132p.
2. Badii, M., Abreu, J. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. International Journal of Good Conscience. 1(1): 82-89.
3. Botelho, L., Mezes, A., Cabral, G., Soares, E., Ryoiti, E., Gomes, R. (2012). Endophytic Colonization by Brazilian Strains of *Bacillus thuringiensis* on Cabbage Seedlings Grown *in Vitro*. Bt Research, 3(3): 11-19. doi: 10.5376/bt.2012.03.0003
4. Borror, D.J., de Long, D., & Triplehorn, C. 1989. An introduction to the study of insects. 6th. ed. Holt Rinehart and Winston. New York. USA. Pp. 345-378.
5. Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, 49(4), 423–435.

6. Buchanan, Gale Arlon (1965). Patterns of surfactant toxicity to plant tissues. Retrospective Theses and Dissertations. Digital Repository Iowa State University
7. Campos, H. A., -Romero, P. J., Cervantes, A. R. y Díaz, C. L. 2006. Manejo integrado para el control de Gusano Barrenador en Caña de Azúcar en el Estado de Morelos. Folleto para el productor N° 44. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro Campo Experimental "Zacatepec". Zacatepec, Morelos, México. Pp 12.
8. Campos, H. A., Cruz y C. E. Canul k. J. 2012. Tecnología para el manejo y control de plagas y enfermedades en caña de azúcar en el estado de Morelos. Folleto para el productor N° 62. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación., Morelos, México.
9. Capinera, L. J., 2001. Sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida.
10. Carmona, A. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* toxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). Bioagro 14(1): 3-10
11. Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology And Biochemistry, 42(5), 669-678. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
12. COFUPRO, 2013. Revisado el 5 de mayo de 2017 de: <http://www.cofupro.org.mx/cofupro/publicaciones.php?publicaciones=384>
13. Dimkpa C.O., Merten D., Svatos A., Büchel G., Kothe E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. Journal of Applied Microbiology. 2009;107:1687–1696.
14. Doncel, M., Chamorro, A., Pérez C. 2016. Activity *in vitro* of bacteria endophytes promoters of growth associated with colosoana pasture in the municipality of Corozal, Sucre. Revista Colombiana Ciencia Animal; 8:351-360.
15. Escolástico, C., Cabildo, Ma., Claramunt, T., Claramunt, R. (2013). Ecología 1: introducción. Organismos y poblaciones. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid pp. 193.
16. Fonseca, G. A. 2011. Aislamiento y virulencia de *Bacillus thuringiensis* sobre *Diatraea magnifactella*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en

Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos .45 pp.

17. Flores, R., 2000. Efecto de la variedad de maíz sobre el desarrollo y la susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) A *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría. Universidad de Colima.
18. García-Suárez, R., Verduzco-Rosasa, L., Del Rincón-Castro, C., Délano-Friera, J., Ibarra, J., 2017. Translocation of *Bacillus thuringiensis* in *Phaseolus vulgaris* tissues and vertical transmission in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Applied Microbiology.
19. Giridhar, B., Jong-Dae K., Byung-Taek O. 2012. Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1. Journal of Hazardous Materials. pp. 477–483
20. Gomes, R., Marcelo, C., Capdeville, G., Jones, G., Soares, E., Praça, L., Arrivabene, B., Vasconcelos, S., Cavalcante, R., Berry, C. (2009). Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. Microbial Biotechnology, 2(4): 512–520
21. Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., & Campisano, A. et al. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. Microbiology And Molecular Biology Reviews, 79(3), 293-320. <http://dx.doi.org/10.1128/mmb.00050-14>
22. Hernández, A. 2015. Aislamiento de microorganismos endófitos en cultivos de caña de azúcar en el estado de Morelos. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
23. Elsa Verónica Herrera Mayorga + Centro De Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México (2012). *Spodoptera frugiperda: una plaga que está coevolucionando*: AlephZero-Comprendamos No.63
24. Hossain F, Pray C, Lu Y, Huang J, Fan C, Hu R. 2004. Genetically modified cotton and farmers' health in China. Int J Occup Environ Health; 10: 296-303.
25. Khetan S. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. 2001. En: Khetan editor. Microbial Pest Control. p. 14.
26. del Rincón Castro, Ma. Cristina, Méndez Lozano, Jesús, Ibarra, Jorge E. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con

- actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *spodoptera frugiperda* (lepidoptera: noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 45 pp 160
27. Castro, M. 2006. Bacterias endófitas de *Cordia alliodora* y *Tabebuia rosea* bertold D.C: Potencial como promotoras del crecimiento vegetal en la propagación de su hospedero. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
28. Lopez, G., 2017. Determinación de Enzimas de Resistencia en Poblaciones de *Spodoptera frugiperda* S. (Lepidoptera: Noctuidae) Procedentes del Estado de Guanajuato. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
29. Melo, A. L. de A., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2014). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 317–326. doi:10.3109/07388551.2014.960793
- 30.
31. Monnerat, R., Batista, A., De Medeiros, P., Martins, E., Melatti, V., Praca, L.; Dumas, V. & colaboradores (2007). Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, 41: 291- 295.
32. Motta, P. & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente & Agua*, 6(2), 1
33. Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3–22.
34. Perez, A., Rojas, J., Vale, H. (2009). Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana ciencia Animal*. 1(2): 286-301
35. Perez, C., Chamorro, A. (2013). Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 5(2), pp.439-462
36. Rives, N., Acebo, Y., Hernández, A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos tropicales* 28 (2) pp. 29-38

37. Ramírez, D. 2010. Bacterias endofíticas aisladas de fresa (*Fragaria ananassa* Dutch.) y su impacto sobre plantas de interés agrícola. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Microbiología.
38. Rodríguez-del-Bosque, L. A. y Vejar-Cota, G. 2008. Barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) del maíz y caña de azúcar, Pp. 9-22. En: Casos de Control Biológico en México. (eds.), H. C. Arredondo Bernal y L. A. Rodríguez del Bosque Ed. Mundi-Prensa, México, España.
39. Rodríguez-del-Bosque, L. A. y J. W. Smith Jr. 1997. Biological control of maize and sugarcane stem borers in México: A review. *Insect Science and its Application*. 17:3, 305-314.
40. Rodríguez del bosque, L., Perez, R., Mata, H. and Avila, J. (2012). Manejo integrado de barrenadores en caña de azúcar en el sur de Tamaulipas. 1st ed. México, D.F., pp.2-5.
41. Saravanan, V., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M. y Sa, T. (2007). Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. *Microbial Ecology*, 55(1), pp.130-140.
42. SEGOB (Secretaría de Gobernación), 2014. Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar 2014-2018. Recuperado el 10 de Octubre de 2016, del siguiente sitio web:  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014)
43. Saldamando, C. & Marquez, E., 2012. Aproximación a la filogenia de Spodoptera (Lepidoptera: Noctuidae) con el uso de un fragmento del gen del la citocromo oxidasa I (COI).
44. SHCP (Secretaría de Hacienda y Crédito Público), 2014. Panorama del Maíz. Recuperado el 10 de Diciembre del siguiente sitio web:  
<http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Ficha%20Ma%C3%ADz.pdf>
45. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2014. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (Caña de azúcar). Recuperado el 1 de Septiembre, 2016, del siguiente sitio web:  
[http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp)
46. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2014. Caña de azúcar. Recuperado el 1 de Septiembre, 2016, del siguiente sitio web:  
[http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/96176/Ca\\_adeaz\\_car\\_monografias.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/96176/Ca_adeaz_car_monografias.pdf)

47. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2016. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (Maíz). Recuperado el 13 de Diciembre de 2016 del siguiente sitio web:  
[http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp)
48. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2018. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (Maíz). Recuperado el 13 de Octubre de 2018 del siguiente sitio web:  
[http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do)
49. SEGOB (Secretaría de Gobernación), 2014. Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar 2014-2018. Recuperado el 10 de Octubre de 2016, del siguiente sitio web:  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014)
50. Valseca, R., Escalante, W., Rodríguez, J., Servín, R., Pastelin, M., & Romero, D. et al. (2003). Azúcar (1st ed., p. 16). Veracruz. Recuperado el 8 de Octubre del 2016 del siguiente sitio web:  
<http://www.cofupro.org.mx/cofupro/Publicacion/Archivos/penit11.pdf>
51. Téllez, A., Cruz, M., Mercado, Y., Asaff, A., Arana, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*. pp 73-80.
52. Torrente, D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos tropicales*; 31(1) pp. 19-26.
53. Trujillo, A. (2009). INIFAP. Guía para cultivar maíz bajo condiciones de temporal en el estado de Morelos. México, D.F., pp.16-18.
54. Valseca, R., Escalante, W., Rodríguez, J., Servín, R., Pastelin, M., & Romero, D. et al. (2003). Azúcar (1st ed., p. 16). Veracruz. Recuperado el 8 de Octubre del 2016 del siguiente sitio web:  
<http://www.cofupro.org.mx/cofupro/Publicacion/Archivos/penit11.pdf>
55. Vega F., Posada F., Aimes C., Pava-Ripoll M., Infante F., Rehner S. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46 (2008), pp. 72–82
56. Vidal, C., Rogers, H., Mahenthalingam, E., Berry, C. (2013). *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogenydependent manner. *Microbiology Ecology*, 1-13 pp.



57. Ficha técnica de barrenador *Diatraea saccharalis*  
[http://www.sipove.gob.mx/Doc\\_SIPOVE/SVegetal/Publica/barrenador/Fichas/FT\\_Barrenador.pdf](http://www.sipove.gob.mx/Doc_SIPOVE/SVegetal/Publica/barrenador/Fichas/FT_Barrenador.pdf) consultado mayo 2014.

## 12. APENDICES

### Apéndice 1: Preparación de solución Birboim

SOLUCIÓN 1	
Glucosa 2M	1.25 mililitros
EDTA 0.5M	1 mililitro
Tris HCl 1M	1.25 mililitros
Agua destilada	54.5 mililitros

SOLUCIÓN 2	
NaOH 5M	4.395 mililitros
SDS al 10%	5.555 mililitros
Agua destilada	90.05 mililitros

SOLUCIÓN 3	
Acetato de potasio 5M	30 mililitros
Ácido acético glacial	5.75 mililitros

\*Aforar a 50 mililitros con agua destilada



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dr. Guadalupe Peña Chora (Co Tutor)  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez  
Dr. Iván Arenas Sosa

Tesis: "ACTIVIDAD ENDOFITA DE LA CEPA Y<sub>15</sub> DE *Bacillus thuringiensis* EN CAÑA DE AZUCAR Y MAIZ, Y SU EFECTO SOBRE *Spodoptera frugiperda*"

Alumno que la presenta a revisión: **ANA VERONICA HERNANDEZ CERVANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dr. Guadalupe Peña Chora (Co Tutor)  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez  
Dr. Iván Arenas Sosa

Tesis: "ACTIVIDAD ENDOFITA DE LA CEPA Y<sub>15</sub> DE *Bacillus thuringiensis* EN CAÑA DE AZUCAR Y MAIZ, Y SU EFECTO SOBRE *Spodoptera frugiperda*"

Alumno que la presenta a revisión: **ANA VERONICA HERNANDEZ CERVANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dr. Guadalupe Peña Chora (Co Tutor)  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez  
Dr. Iván Arenas Sosa

Tesis: "ACTIVIDAD ENDOFITA DE LA CEPA Y<sub>15</sub> DE *Bacillus thuringiensis* EN CAÑA DE AZUCAR Y MAIZ, Y SU EFECTO SOBRE *Spodoptera frugiperda*"

Alumno que la presenta a revisión: **ANA VERONICA HERNANDEZ CERVANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dr. Guadalupe Peña Chora (Co Tutor)  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez  
Dr. Iván Arenas Sosa

Tesis: "ACTIVIDAD ENDOFITA DE LA CEPA Y<sub>15</sub> DE *Bacillus thuringiensis* EN CAÑA DE AZUCAR Y MAIZ, Y SU EFECTO SOBRE *Spodoptera frugiperda*"

Alumno que la presenta a revisión: **ANA VERONICA HERNANDEZ CERVANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dr. Guadalupe Peña Chora (Co Tutor)  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez  
Dr. Iván Arenas Sosa

Tesis: "ACTIVIDAD ENDOFITA DE LA CEPA Y<sub>15</sub> DE *Bacillus thuringiensis* EN CAÑA DE AZUCAR Y MAIZ, Y SU EFECTO SOBRE *Spodoptera frugiperda*"

Alumno que la presenta a revisión: **ANA VERONICA HERNANDEZ CERVANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. IVAN ARENAS SOSA