



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB)

Caracterización de aislados bacterianos patógenos al pulgón amarillo
(Melanaphis sacchari Zehntner)

Tesis

**Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Naturales:
Línea Terminal en Biotecnología**

Presenta

Erubiel Toledo Hernández

Tutor: Dr. Guadalupe Peña Chora
Co-tutor: Dr. Víctor M. Hernández Velázquez

Cuernavaca, Morelos.

Junio del 2018

Contenido

Resumen	1
Introducción	2
CAPÍTULO I	5
Antecedentes	5
1.1 <i>Melanaphis sacchari</i> (Hemiptera: Aphididae)	5
1.1.1 Sinonimia <i>M. sacchari</i> y clasificación taxonómica.....	5
1.1.2 Descripción morfológica	6
1.1.3 Ciclo biológico	7
1.1.4 Distribución geográfica de la plaga.....	9
1.1.5 Plantas hospederas de <i>Melanaphis sacchari</i>	10
1.1.6 Importancia económica	11
1.1.7 Daños ocasionados en el cultivo de sorgo	11
1.2 Control cultural	12
1.2.1 Control químico	13
1.2.3 Control biológico	14
1.3 Bacterias entomopatógenas	16
1.3.1 El género <i>Pantoea</i> con potencial de especies entomopatógenas	18
1.4 Toxinas con efecto insecticida contra la familia Aphididae.....	19
1.4.1 Proteínas Cry con efecto insecticida contra áfidos	19
1.4.2 Proteínas Cyt con efecto insecticida contra áfidos	20
1.4.3 Proteínas Vip con efecto insecticida contra áfidos	21
1.5 Mecanismo de acción de las proteínas insecticidas	22
1.5.1 Toxinas Cry y su mecanismo de acción	22
1.5.2 Modelo de formación de poro.....	22

1.5.3 Modelo de transducción de señales	23
1.5.4 Otros tejidos blanco de proteínas y metabolitos insecticidas	24
1.6 Justificación.....	28
1.6.1 Hipótesis	29
1.6.2 Objetivo general.....	29
1.6.3 Objetivos específicos.....	29
CAPÍTULO II.....	30
Materiales y métodos.....	30
2.1 Colecta de cadáveres de <i>M. sacchari</i> en cultivos de sorgo del Estado de Morelos	30
2.1.1 Aislamiento de bacterias de cadáveres de <i>M. sacchari</i>	30
2.1.2 Establecimiento del pie de cría de <i>M. sacchari</i> en plantas de sorgo (variedad M550)	31
2.2 Selección de aislados bacterianos patógenos a <i>M. sacchari</i> mediante bioensayos de patogenicidad	32
2.2.1 Determinación de la CL ₅₀ de los aislados bacterianos patógenos a <i>M. sacchari</i>	34
2.3 Identificación molecular de la especie de los aislados bacterianos patógenos a <i>M. sacchari</i> amplificando los genes marcadores 16S ARNr, <i>leuS</i> y <i>gyrB</i>	34
2.3.1 Secuenciación de los genes de interés 16S ARNr, <i>leuS</i> y <i>gyrB</i> amplificados por PCR.....	36
2.3.2 Análisis de las secuencias de los genes 16S ARNr, <i>leuS</i> y <i>gyrB</i>	36
2.4 Solubilización del cristal proteico de las cepas ET-90, ET-30 y ET-15	36
2.4.1 Purificación parcial de la proteína mediante cromatografía líquida de alta resolución (<i>HPLC</i>)	37

2.4.2 Bioensayo de toxicidad con la proteína parcialmente pura.....	37
2.5 Bioensayos de especificidad de la cepa ET-90 contra insectos plaga de diferente Orden.....	38
2.5.1 Bioensayos de patogenicidad contra <i>Epilachna varivestis</i> Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae).....	38
2.5.2 Bioensayos de patogenicidad contra <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus (Diptera: Culicidae).....	39
2.5.3 Bioensayos de patogenicidad contra <i>Apis mellifera</i> Linnaeus (Hymenoptera: Apidae).....	40
2.6 Determinación de la actividad de enzimas líticas; quitinasas, proteasas y fosfolipasas	41
2.6.1 Confirmación por Western blot de la presencia de proteínas del tipo S-layer en la cepa ET-15.....	42
2.7 Transformación de la cepa de <i>Pantoea deleyi</i> ET-90 con el plásmido pmCherry-BA y localización en el intestino de <i>M. sacchari</i> mediante estereoscopio de epifluorescencia.....	43
2.7.1 Preparación de células electrocompetentes de la cepa ET-90	43
2.7.2 Transformación de la cepa ET-90 con el plásmido pmCherry-BA mediante electroporación.....	43
2.7.3 Localización de la cepa ET-90 en el intestino de <i>M. sacchari</i> mediante estereoscopio de epifluorescencia	44
2.8 Estadístico	45
CAPÍTULO III	46
Resultados	46
3.1 Colecta de cadáveres de <i>M. sacchari</i> en cultivos de sorgo del Estado de Morelos	46

3.2 Aislamiento de bacterias de cadáveres de <i>M. sacchari</i>	47
3.3 Establecimiento del pie de cría de <i>M. sacchari</i> en plantas de sorgo (variedad M550).....	48
3.4 Selección de aislados bacterianos patógenos a <i>M. sacchari</i> mediante bioensayos de patogenicidad	49
CAPÍTULO IV	51
Caracterización de la cepa ET-90 patógena a <i>M. sacchari</i>	51
4.1 Determinación de la CL ₅₀ de la cepa ET-90.....	51
4.2 Identificación molecular de la cepa ET-90 mediante los genes marcadores 16S ARN ribosomal y Leucil-ARNt sintetasa (<i>leuS</i>).....	52
4.3 Análisis mediante BLAST de las secuencias de nucleótidos del 16S ARN ribosomal y Leucil-ARNt sintetasa (<i>leuS</i>)	53
4.4 Análisis filogenético de la cepa <i>Pantoea deleyi</i> ET-90	54
4.5 Solubilización de la proteína mayoritaria de <i>P. deleyi</i> ET-90	56
4.5.1 Purificación parcial de la proteína mayoritaria mediante <i>HPLC</i>	57
4.5.2 Bioensayo de toxicidad con la proteína parcialmente pura.....	58
4.6 Bioensayos de especificidad de <i>P. deleyi</i> ET-90 contra insectos plaga de diferente Orden	58
4.6.1 Bioensayos de patogenicidad contra <i>Epilachna varivestis</i> Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus (Diptera: Culicidae) y <i>Apis mellifera</i> Linnaeus (Hymenoptera: Apidae).....	58
4.7 Determinación de la actividad de enzimas líticas; quitinasas, proteasas y fosfolipasas	58
4.8 Transformación de la cepa ET-90 con el plásmido pmCherry-BA y su localización en el intestino de <i>M. sacchari</i> mediante estereoscopio de epifluorescencia.....	60

CAPÍTULO V	64
Caracterización de la cepa ET-30 patógena a <i>M. sacchari</i>	64
5.1 Determinación de la CL₅₀ de la cepa ET-30	64
5.2 Identificación molecular de la cepa ET-30 mediante el gen marcador <i>gyrB</i>	65
5.3 Análisis mediante BLAST de la secuencia de nucleótidos del gen <i>gyrB</i>	66
5.4 Análisis filogenético de la cepa <i>Bacillus</i> ET-30	66
5.5 Solubilización de la proteína mayoritaria de <i>Bacillus</i> ET-30	68
5.6 Bioensayo de toxicidad con la proteína solubilizada	69
5.7 Determinación de la actividad de enzimas líticas; quitinasas, proteasas y fosfolipasas	69
CAPÍTULO VI.....	71
Caracterización de la cepa ET-15 patógena a <i>M. sacchari</i>	71
6.1 Determinación de la CL₅₀ de la cepa ET-15	71
6.2 Identificación molecular de la cepa ET-15 mediante el gen marcador <i>gyrB</i>	72
6.3 Análisis mediante BLAST de la secuencia de nucleótidos del gen <i>gyrB</i>.....	73
6.4 Análisis filogenético de la cepa <i>Bacillus</i> ET-15	73
6.5 Solubilización de la proteína mayoritaria de <i>Bacillus</i> ET-15	75
6.6 Bioensayo de toxicidad con la proteína solubilizada	76
6.7 Determinación de la actividad de enzimas líticas; quitinasas, proteasas y fosfolipasas	76
6.8 Confirmación por Western blot de la presencia de proteínas del tipo S-layer en la cepa ET-15.....	77
CAPÍTULO VII	79
Discusión.....	79
Conclusiones.....	87

Perspectivas	88
Bibliografía	89
Anexos	103

Resumen

Melanaphis sacchari es una plaga originaria de África que actualmente está distribuida en los 5 continentes. Entre el 2013 y 2015 quedó demostrada su capacidad destructiva en cultivos de sorgo de Estados Unidos y México, ocasionando pérdidas estimadas en billones de dólares. El manejo de esta plaga se lleva a cabo a través del uso indiscriminado de plaguicidas, incrementando con ello la resistencia a corto plazo, además de contaminar el ambiente. Debido a la falta de conocimiento de especies de bacterias entomopatógenas para este áfido, el objetivo de este trabajo fue caracterizar cepas bacterianas patógenas a *M. sacchari*, las cuales puedan ser una opción en un futuro dentro de los programas de manejo integrado de plagas. En octubre del 2015, se realizaron 7 colectas de especímenes de *M. sacchari* en diferentes lugares de la zona oriente del Estado de Morelos, siendo que en ese periodo esta plaga devastó los cultivos de sorgo. De las muestras se seleccionaron cadáveres de *M. sacchari*, sembrándolos en medio LB y a partir de colonias bacterianas se obtuvieron cultivos axénicos. Se aislaron un total de 80 cepas bacterianas, 20 de ellas presentaron características similares al género *Bacillus*; visualizándose las estructuras conocidas como cuerpo paraesporal (cristal proteico). Bioensayos preliminares de patogenicidad demostraron que 4 de 7 cepas identificadas como ET-5, ET-15, ET-30 y ET-90 fueron patógenas para el áfido. Mediante unidades formadoras de colonias la cepa ET-90 presentó una CL_{50} de 1.02×10^8 UFC/mL; en tanto que, por medio de proteína total se obtuvo la CL_{50} de las cepas ET-30 y ET-15, siendo de 32.09 $\mu\text{g/mL}$ y 49.3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La identificación molecular de la cepa ET-90 se realizó a través del gen marcador *leuS*, demostrando una identidad del 99% con la especie *Pantoea deleyi*, en tanto que la cepa ET-15 y ET-30 fueron identificadas mediante el gen marcador *gyrB*, denotando una identidad de un 99% con especies del género *Bacillus*. *P. deleyi* ET-90 fue transformada con el plásmido pmCherry-BA, visualizando por medio de epifluorescencia una obstrucción del intestino medio del áfido debido a la formación de agregados celulares. Por otra parte, un análisis cualitativo de proteasas y fosfolipasas demostró que las cepas ET-15 y ET-30 producen dichas enzimas, proteínas ya reportadas como factores de virulencia en microorganismos entomopatógenos.

Introducción

El pulgón amarillo (*Melanaphis sacchari* Zehntner), también conocido como el áfido de la caña de azúcar, es un insecto plaga originario de África que actualmente se encuentra distribuido en Asia, Australia, Centro y Sudamérica; alrededor de 20 cultivos pertenecientes a la familia de las Poaceae son sus hospederos (Singh et al., 2004). Además de ejercer un daño directo a la planta, este áfido puede ser un vector de enfermedades virales; transmitiendo virus tales como el mosaico de la caña de azúcar, virus de hoja amarilla de la caña de azúcar, entre otras enfermedades (Singh et al., 2004; SENASICA, 2014).

Esta plaga exótica se reportó por primera vez en cultivos de sorgo del Estado de Tamaulipas, México en noviembre del 2013. Las afectaciones fueron severas y se estimó que hubo de entre 30 a 100 % de daños al cultivo en las temporadas de primavera y otoño, catalogándose como una nueva plaga de la región (Rodríguez del Bosque y Terán, 2015; SENASICA, 2014). Hasta el año de 2013 sólo estaba reportada para Tamaulipas, sin embargo, a finales del 2014 ya se había dispersado a los estados de Coahuila, Nuevo León, Guanajuato, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa y Veracruz (Rodríguez del Bosque y Terán, 2015). En el 2015, se reportó por primera vez la presencia de esta plaga en el Estado de Morelos, causando afectaciones en el cultivo de sorgo en un 70 % de la superficie total sembrada; y una pérdida económica en los productores estimada de 210 millones de pesos. Cabe mencionar que el sorgo es el segundo cultivo de mayor importancia en México con poco más de dos millones de hectáreas (ha) sembradas anualmente; con un valor de cosecha en el 2013 de 1.4 billones de dólares (SIAP, 2014).

Para el control de este insecto, estudios en campo demostraron que productos como imidacloprid, sulfoxaflor, espirotetramat, tiametoxam y metamidofos presentan una efectividad mayor al 90% de mortalidad (Rodríguez del Bosque y Terán, 2015). No obstante, es ampliamente conocido que estos generan problemas de contaminación ambiental, efectos adversos a la salud del hombre y eliminación de los enemigos naturales del áfido. Además, la utilización de estos productos químicos genera presión de selección en las poblaciones de insectos a controlar y por lo tanto el desarrollo de resistencia, por lo que su uso se vuelve ineficiente (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

Cabe destacar, que el potencial de reproducción del pulgón amarillo es muy elevado, teniendo hasta 96 ninfas por hembra y un promedio de 56 generaciones anuales (Singh et al., 2004; SENASICA, 2014); incrementando con ello la probabilidad de que algunos especímenes generen resistencia a los plaguicidas, heredando tal característica rápidamente a las nuevas generaciones de áfidos (Field et al., 1988; Sarwar, 2015).

Igualmente, se puede emplear el control cultural para disminuir la población de esta plaga. No obstante, este tipo de medidas son más preventivas que de eliminación en el cultivo; ya que consisten en cortar la soca después de cosechar, y erradicar los hospederos silvestres alternativos como pastos y zacates (SENASICA, 2014; INIFAP, 2014). El control biológico es una herramienta alternativa más amigable con el medio ambiente para el manejo de plagas insectiles, de lo cual existen trabajos exitosos realizados alrededor del mundo (Lacey et al., 2015).

Es importante resaltar que en México y el Estado de Morelos se siembran distintos cultivos de importancia agrícola que podrían ser sus hospederos alternativos; siendo de los

que se siembran en mayor superficie el maíz, caña de azúcar y avena (SENASICA, 2014), razón por la cual es importante manejar este insecto a niveles poblacionales que no causen pérdidas en la producción de los cultivos agrícolas en México. Por otra parte, la falta de conocimiento sobre especies bacterianas patógenas a esta plaga fue motivo para establecer el objetivo principal de este trabajo, que fue caracterizar cepas de bacterias patógenas a *M. sacchari*, las cuales puedan ser utilizadas en un futuro dentro de los programas de manejo integrado de plagas.

CAPÍTULO I

Antecedentes

1.1 *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae)

El pulgón amarillo es un insecto plaga cuyo origen es África y que a la fecha se ha diseminado en países de los cinco continentes; África, Asia, Oceanía, Europa y América (SENASICA, 2014). Este áfido afecta principalmente cultivos de la familia Poaceae como; sorgo, caña de azúcar, maíz, trigo, cebada, avena, entre otros (Singh et al., 2004; SENASICA, 2014).

1.1.1 Sinonimia *M. sacchari* y clasificación taxonómica

En el transcurso de los años diferentes taxónomos han dado distintos nombres al pulgón amarillo encontrándose los siguientes sinónimos en la literatura: *Aphis pheidolei* (Theobald), *Aphis sacchari* (Zehntner), *Aphis sorghella* (Schouteden), *Aphis sorgui* (Theobald), *Longiunguis sacchari* (Zehntner), *Melanaphis sorgui* (Theobald), *Rhopalosiphum sacchari* (Zehntner), *Sipha sacchari* (Zehntner), *Uraphis sorgui* (Theobald) (SENASICA, 2014). En el Cuadro 1 se presenta la clasificación taxonómica vigente de *M. sacchari*.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Melanaphis sacchari* (Zehntner, 1897)

Taxonomía	
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Familia	Aphididea
Género	<i>Melanaphis</i>
Especie	<i>sacchari</i>

www.itis.gov

1.1.2 Descripción morfológica

El pulgón amarillo en su etapa adulta llega a medir aproximadamente de 1.1 a 2 mm de largo. Tienen dos apéndices de color negro en la parte posterior del cuerpo, conocidos como sifúnculos (Fig. 1a). Los pulgones comúnmente son de color amarillo durante la mayor parte de su vida, pero en ocasiones se tornan de color grisáceo a pardo o marrón. Al respecto, se conoce que el tipo de planta hospedante influye de manera importante en el color del pulgón. Algunos especímenes son ápteros o alados (Fig. 2), siendo estos últimos de color oscuro en las antenas, cabeza y tórax; el desarrollo de biotipos alados está relacionado con la migración cuando las condiciones climáticas son adversas o hay falta de plantas huésped. Los adultos ápteros presentan marcas dorsales escleróticas oscuras (Fig. 1b), las antenas se tornan más oscuras hacia las puntas con una longitud poco mayor a la

mitad del cuerpo (Fig. 1c); sus seis patas con color similar al cuerpo tornándose oscuras en la punta (Fig. 1d). El aparato bucal es picador-chupador, teniendo ojos rojos desde su nacimiento (Fig. 2a) (SENASICA, 2014; INIFAP, 2014).

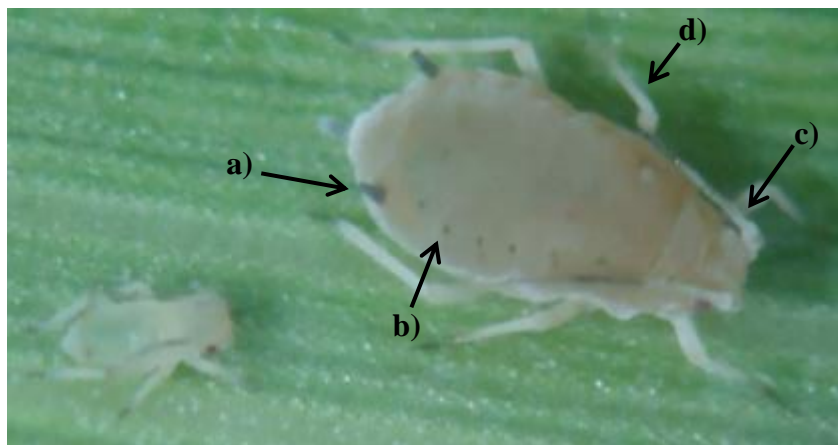


Figura 1. Pulgón amarillo adulto y ninfa alimentándose de savia en plantas de sorgo.

a) Sifúnculos, b) Marcas escleróticas dorsales, c) Antena, d) Pata.

1.1.3 Ciclo biológico

La reproducción del pulgón amarillo es vivípara (partenogénesis) y predominantemente es de manera asexual por hembras ápteras y aladas (Fig. 2a, b). *M. sacchari* alcanza la adultez aproximadamente en 5.4 días a 25 °C, pasando por cuatro estadios ninfales. La forma áptera tiene una longevidad de dos semanas hasta 28 días, dependiendo de las condiciones ambientales. Pueden tener hasta 96 ninfas por hembra y un promedio de 56 generaciones anuales (Singh et al., 2004; SENASICA, 2014).

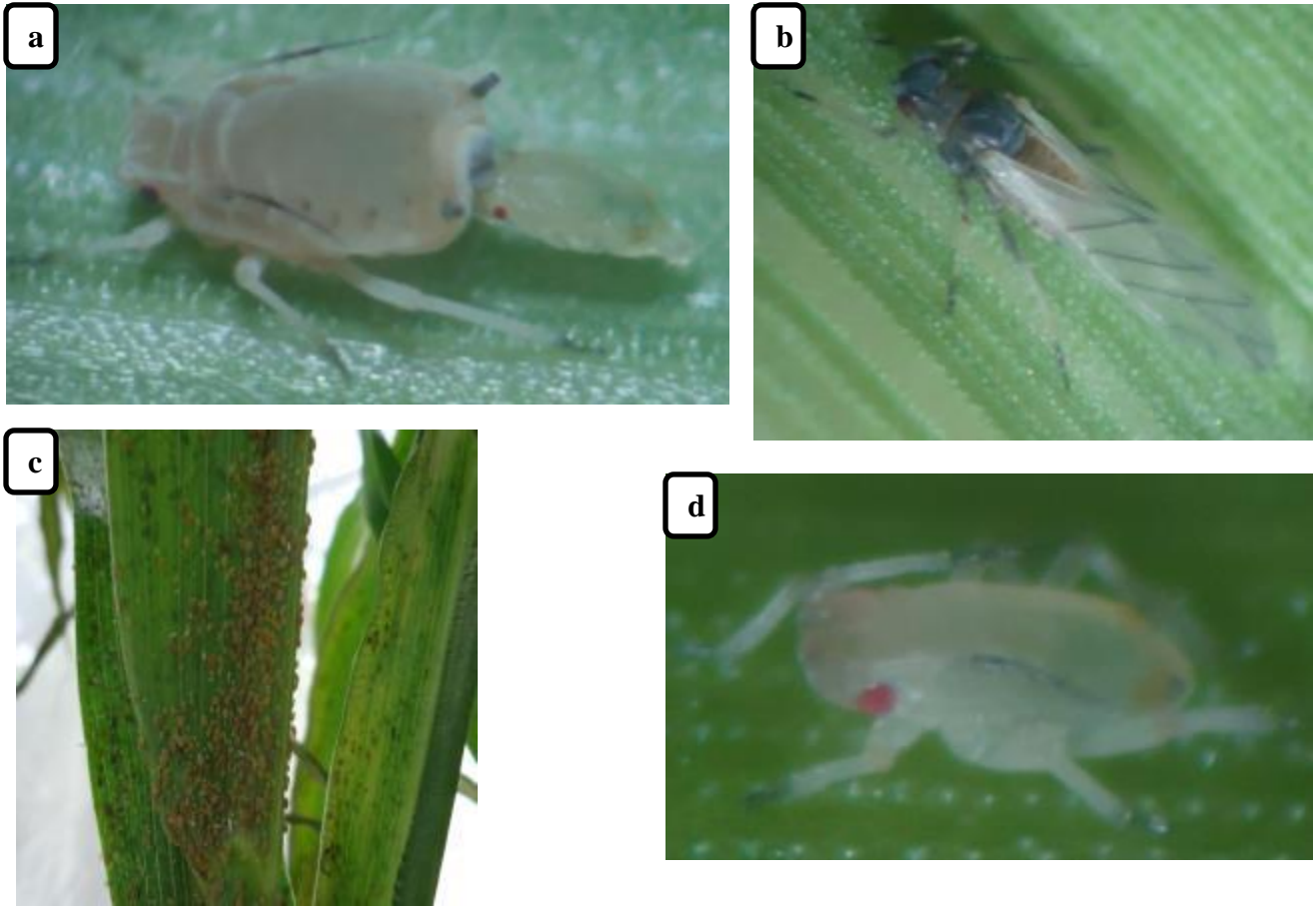


Figura 2. Hembra áptera y alada y estados ninfales. a) Pulgón amarillo adulto teniendo una cría por partenogénesis. b) Pulgón amarillo alado alimentándose de savia de hoja de sorgo. c) Colonia de pulgones alimentándose de savia en el envés de hoja de sorgo. d) Ninfa de pulgón amarillo sobre la superficie de una hoja de sorgo.

Se sabe que la temperatura de entre 15 a 25 °C es óptima para extender su vida promedio. Por otra parte, los especímenes alados presentan un menor tiempo de vida, siendo alrededor de 7.5 días; con un promedio de 10.6 ninfas por hembra. Tienen hábitos gregarios, es decir, se agrupan en grandes poblaciones o colonias (Fig. 2c), pudiendo infestar hasta 30 000 áfidos a una sola planta. Estos hibernan en socas de sorgo y huéspedes

silvestres alternos como; zacates o pastos (SENASICA, 2014; INIFAP, 2014; Singh et al., 2004).

1.1.4 Distribución geográfica de la plaga

El pulgón amarillo es conocido en otras partes del mundo como áfido de la caña de azúcar, tiene su sitio de origen en África. A la fecha, se encuentra distribuido en países de los cinco continentes (Fig. 3) como España, Australia, Filipinas, China, India, Brasil, Venezuela, Sudáfrica, Nigeria; entre muchos otros (Singh et al., 2004). En Norteamérica este insecto se reportó por primera vez en la Florida en 1977 (Mead, 1978). En Louisiana en 1999 y desde el siglo antepasado en la isla de Hawái (1896). En el año 2013 afectó los cultivos de sorgo establecidos en Louisiana, Mississippi, Oklahoma y Texas (Bowling et al., 2016). Se cree que de este último Estado se dispersó hacía en el noreste de México en Tamaulipas. Actualmente, se encuentra en diferentes estados de la República Mexicana como: Coahuila, Nuevo León, Guanajuato, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Veracruz y Morelos (Rodríguez del Bosque y Terán, 2015). Teniendo en cuenta la rápida dispersión de esta plaga, no es de extrañarse que recientemente haya sido reportado en la frontera sur de México en el Estado de Chiapas (Marina et al., 2017).

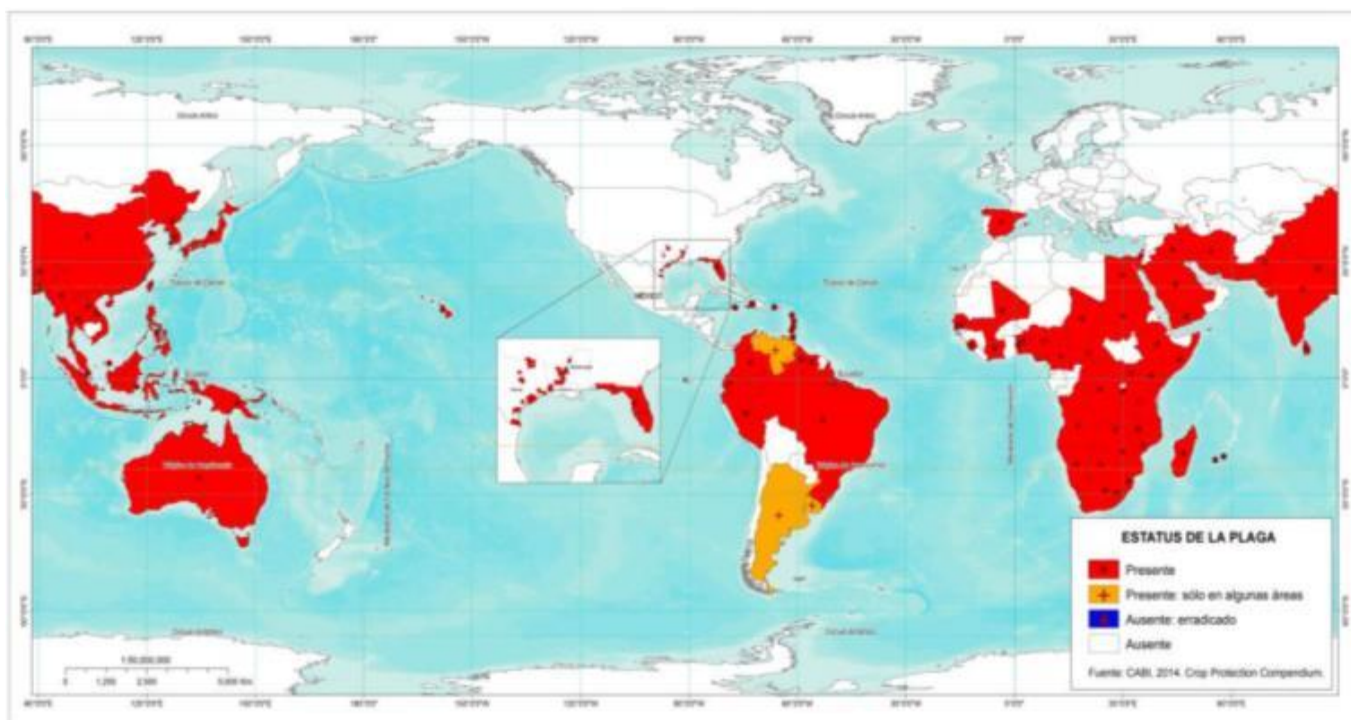


Figura 3. Mapa de distribución mundial de *Melanaphis sacchari* (créditos: SENASICA, 2014).

1.1.5 Plantas hospederas de *Melanaphis sacchari*

Hasta la década pasada *M. sacchari* era una plaga menor, sin embargo, su presencia ha ido incrementando rápidamente desde los años 70's. El género *Melanaphis* ha sido asociado a la familia de las Poaceae, afectando diferentes especies de los géneros *Saccharum*, *Sorghum*, *Oryza*, *Panicum* y *Pennisetum* (Blackman y Eastop, 1984). Dentro de sus hospederos primarios se encuentra el sorgo, caña de azúcar, avena, trigo, cebada; y entre los secundarios está el arroz, maíz, algunos pastos y zacates (Singh et al., 2004). Según datos del SIAP (2014), en México el cultivo hospedante primario con mayor superficie sembrada es sorgo, con 2, 203,639.4 hectáreas (ha), le sigue avena con 946,797.72 ha y caña de azúcar con 826,614.29 ha. El maíz, que es considerado una planta

huésped secundaria, tiene una superficie de 8, 033,197.5 ha. Rodríguez del Bosque y Terán (2015), mencionan que en México el pulgón amarillo sólo se alimenta y sobrevive en sorgo y el zacate Johnson *Sorghum halepense* (L.), pero no en caña de azúcar o trigo; aunque en estudio de Salas et al. (2017) lo reportan en cultivos de maíz en el Estado de Chiapas, ellos identificaron que el áfido prefiere al zacate Johnson como huésped.

1.1.6 Importancia económica

Aunque en México se conoce la especificidad del pulgón amarillo hacía el sorgo, la posibilidad de que pueda utilizar sus hospederos alternos es muy alta. Los datos del SIAP (2014) hacen mención que la producción de sorgo, caña de azúcar, granos y cereales (Poaceae) en México asciende a 13, 036 822.80 ha de superficie sembrada; con un valor superior a los 153 billones de pesos anuales. Es por ello que la introducción y diseminación de esta plaga podría afectar la producción de estos cultivos si no se toman medidas preventivas de manejo.

1.1.7 Daños ocasionados en el cultivo de sorgo

Los daños ocasionados por *M. sacchari* pueden ser de dos formas: de manera directa los áfidos se alimentan de la savia de la planta ubicándose en el envés de las hojas y también en el tallo. Desde que la planta emerge, el áfido puede estar llevando a cabo su daño y de acuerdo a sus densidades poblacionales pudiera llegar a secar la planta en poco tiempo. Por otra parte, el pulgón amarillo causa daños indirectos ya que es un vector de diferentes virus fitopatógenos como del mosaico de la caña de azúcar, virus de hoja amarilla de caña de azúcar, entre otros. Además de transmitir también hongos como

Macrophomina phaseolina (Singh, 2004; Blackman y Eastop, 1984). Durante la alimentación de *M. Sacchari*, elimina sustancias azucaradas que excreta en las superficies de las hojas, permitiendo con ello que hongos saprófitos crezcan en éstas impidiendo el paso de la luz solar e interfiriendo en la fotosíntesis, provocando síntomas cloróticos foliares. A la vez, esto afecta el llenado del grano del sorgo (panoja) reduciendo la calidad del producto y mermando el rendimiento de la cosecha o en algunos casos provocando la pérdida total del cultivo (SENASICA, 2014; INIFAP, 2014).

1.2 Control cultural

El control cultural se realiza empleando diferentes medidas preventivas para disminuir la población de la plaga. Dentro de estas se encuentra la siembra temprana del sorgo para evitar que el cultivo lleve a cabo su ciclo de desarrollo durante la canícula, dando como resultado que el cultivo escape del ataque del áfido o sus poblaciones sean tan bajas que no afecten el rendimiento de la cosecha. Ya es muy bien conocido este fenómeno natural, el cual trae consigo la disminución de las lluvias por lo que incrementa rápidamente la proliferación de la plaga. Así también, se recomienda erradicar antes y durante el cultivo los hospederos silvestres alternativos como pastos y zacates, aunado al uso de trampas amarillas para atrapar a los áfidos durante su migración; además de cortar la soca después de cosechar. También es necesario evitar el estrés hídrico y deficiencias nutricionales los cuales incrementan la susceptibilidad de la planta al ataque del pulgón amarillo (SENASICA, 2014; INIFAP, 2014).

1.2.1 Control químico

Este tipo de manejo se recomienda utilizarlo como último recurso para el control de la plaga, ya que trae consigo efectos adversos al medio ambiente y la salud humana, elimina enemigos naturales y provoca el resurgimiento de la plaga. Los expertos sugieren realizar aplicaciones dirigidas a las áreas de la planta con mayores poblaciones insectiles para eficientizar el control. Algunos productos químicos apropiados para el control de áfidos son Pirimicarb (en cultivos de maíz y trigo), Malatión (en arroz, avena, cebada, maíz, pastizales, pastos, sorgo y trigo), Imidacloprid (en caña de azúcar, cebada, cártamo, maíz, sorgo y trigo), y Tiametoxam (en maíz, y trigo) (Coto y Saunders, 2004; DGIAAP-SENASICA, 2013).

La recomendación que se lleva a cabo en otros países es aplicar el control químico con un promedio de 50 pulgones por planta, aunque se deben tomar en cuenta diferentes factores como el desarrollo y vigor del cultivo, así como condiciones del clima y presencia de fauna benéfica.

Sin embargo, es ampliamente conocido que estos productos generan problemas de resistencia en las poblaciones de insectos a controlar (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007). La elevada tasa de fecundidad de *M. sacchari* incrementa la probabilidad de que algunos especímenes presenten resistencia a los insecticidas, heredando esta particularidad de manera rápida a las nuevas generaciones de áfidos (Field et al., 1988; Sarwar, 2015).

1.2.3 Control biológico

El control biológico es una disciplina que ha tomado fuerza en las últimas décadas. Esta alternativa es más amigable para el manejo de plagas insectiles; además de no ser agresiva con el medio ambiente, no se presentan efectos adversos a la salud humana o afectaciones a enemigos naturales de las plagas. Existen trabajos exitosos en distintos países utilizando diferentes organismos para el manejo de plagas de interés agrícola tales como; bacterias, hongos, virus, nemátodos, depredadores y parasitoides (Lacey et al., 2015; Tjamos et al., 2010).

Alrededor del mundo se conocen aproximadamente 47 especies de enemigos naturales de *M. sacchari*. Dentro de los depredadores y parasitoides que se han visto de manera natural afectando las poblaciones de *M. sacchari* en cultivos de sorgo en México, se encuentran distintas especies pertenecientes a diferentes familias. En Sinaloa se identificaron ocho especies de crisopas: *Ceraeochrysa caligata* (Banks), *C. cubana* (Hagen), *Ceraeochrysa sp. nr. cincta* (Schneider), *C. valida* (Banks), *C. externa* (Hagen), *C. rufilabris* (Burmeister), *Chrysoperla carnea s. lat.* (Stephens), *C. comanche* (Banks) y *C. carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Según los autores del trabajo *C. cubana* presentó frecuente presencia y abundancia en colonias de *M. sacchari*, por lo que recomiendan la cría masiva de este insecto para utilizarlo como controlador biológico (Cortez-Mondaca et al., 2016). En el Estado de Colima Berlanga-Padilla et al. (2016), observaron en cultivos de sorgo poblaciones de *M. sacchari* micosadas; pruebas de identificación morfológica y biología molecular demostraron que este hongo entomopatógeno correspondía a la especie *Lecanicillium longisporum*. En un estudio realizado por personal del Centro Nacional de

Referencia de Control Biológico (CNRCB) y del INIFAP (Río Bravo, Tamps.), se identificaron once especies de la familia Coccinellidae (Coleoptera) depredando a *M. sacchari*: *Coccinella septempunctata* (L.), *Coleomegilla maculata* (Degeer), *Cycloneda sanguinea sanguinea* (L.), *Hippodamia convergens* (Guerin), *Olla v-nigrum* (Mulsant), *Brachiacantha decora* (Casey), *Hyperaspis wickhami* (Casey), *Diomus roseicollis* (Mulsant), *D. terminatus* (Say), *Scymnus (Pullus) loewii* (Mulsant) y *Scymnus (Pullus) sp.*, estas especies ya han sido reportadas alrededor del mundo como enemigos de esta plaga (Rodríguez del Bosque et al., 2018).

Aunque estos parasitoides y depredadores son incapaces de prevenir el daño provocado por los áfidos, en ocasiones de manera natural y bajo ciertos factores ambientales, pueden mantener los niveles poblacionales de la plaga por debajo del umbral de daño económico en sorgo.

Desde finales del siglo antepasado (XIX) en Hawái se comenzó a introducir depredadores y parasitoides para el manejo de distintas plagas y malezas. Dentro de estos insectos benéficos introducidos hubo algunos que se emplearon para disminuir las poblaciones de *M. sacchari*. En 1894 en Hawái se introdujo por primera vez al depredador *Coelophora inaequalis* (Coleoptera: Coccinellidae) para el control de *M. sacchari*.

Posteriormente, en 1908 se liberó la especie *O. abdominalis* (Coleoptera: Coccinellidae); igualmente, en 1919 se introdujo a *Nesomicromus navigatorum* (Neuroptera: Hemerobiidae) y en 1923 *Lysiphlebius testaceipes* (Funasaki et al., 1988). Sin embargo, la mayoría de las veces el establecimiento de los depredadores carece de éxito y las liberaciones tienen que ser masivas y varias veces por año; lo que conlleva al

incremento de costos en el manejo de las plagas y por lo tanto al abandono de estos métodos de control.

Por otra parte, trabajos relacionados al control biológico de *M. sacchari* utilizando hongos entomopatógenos son escasos, Hall en (1987) identificó a *Verticillium lecanii* como hongo parásito de *M. sacchari* en cultivos de sorgo de la Florida. A pesar de esta información, no existe estudio que evidencie o reporte formulados de hongos entomopatógenos para el manejo de este áfido. Aunado a esto, a la fecha no hay estudios que evidencie alguna especie de bacteria que afecte de manera natural las poblaciones de *M. sacchari* en cultivos de sorgo.

1.3 Bacterias entomopatógenas

Las bacterias son microorganismos que se pueden encontrar en todos los hábitat o ecosistemas del planeta, presentando algunas especies cierto tipo de interacción con otros organismos perteneciente a otro reino de la biología como: Plantae, Animalia, Protista y Fungi (Lee et al., 2013; Chow et al., 2010). En los insectos se han evidenciado relaciones simbióticas coevolutivas esenciales para la supervivencia del hospedero/simbionte (Wilson y Duncan, 2015). Mientras que algunas bacterias establecen cierto nivel de mutualismo habitando en el cuerpo del insecto, solo un número limitado de bacterias llegan a ser patógenas para estos (Ruiu, 2015).

Los entomopatógenos se definen como cualquier micro o macroorganismos que puede causar enfermedad y muerte a un insecto. Partiendo de este principio, las bacterias entomopatógenas son aquellas que pueden causar algún desequilibrio en el organismo hospedero lo cual da origen a una patología; y en consecuencia ocasionará la muerte del

insecto. Esta clase de bacterias ya se han utilizado en el manejo de plagas insectiles desde hace algunas décadas, comúnmente presentan una elevada patogenicidad; teniendo un menor número de insectos blanco con respecto a los productos de síntesis química (Ruiu, 2015).

La familia *Bacillaceae* ha representado tradicionalmente al grupo de bacterias entomopatógenas, aportando este grupo al mercado mayor cantidad de productos para el control biológico. Dentro de las bacterias representantes de esta familia se encuentran; *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus sphaericus* (Meyer & Neide) (Ahmed et al., en Ruiu, 2015) *Paenibacillus* spp. y *Brevibacillus laterosporus* (Laubach). También, existen especies de entomopatógenas pertenecientes a la clase de las Gammaproteobacterias tales como *Serratia* spp., *Yersinia entomophaga* (Hurst et al., 2011) y *Pseudomonas entomophila* (Mulet et al., en Ruiu, 2015). Igualmente y no menos importantes, las bacterias simbioses de nemátodos *Photorhabdus* spp. y *Xenorhabdus* spp. (Mulet et al., en Ruiu, 2015). Investigaciones más recientes han evidenciado que especies de la clase Betaproteobacterias presentan propiedades insecticidas de amplio espectro. Este grupo incluye especies del género *Burkholderia* spp. y *Chromobacterium* spp. Últimamente, algunos géneros de actinobacterias como *Streptomyces* spp. y *Saccharopolyspora* spp. han ganado gran interés científico y comercial en la obtención de diversos metabolitos secundarios que actúan como potentes insecticidas (Ruiu, 2015). El mercado de los bioplaguicidas ha ido tomando fuerza durante los últimos años, siendo dominado principalmente por los de origen bacteriano ocupando alrededor del 70% del mercado (Fig. 4)

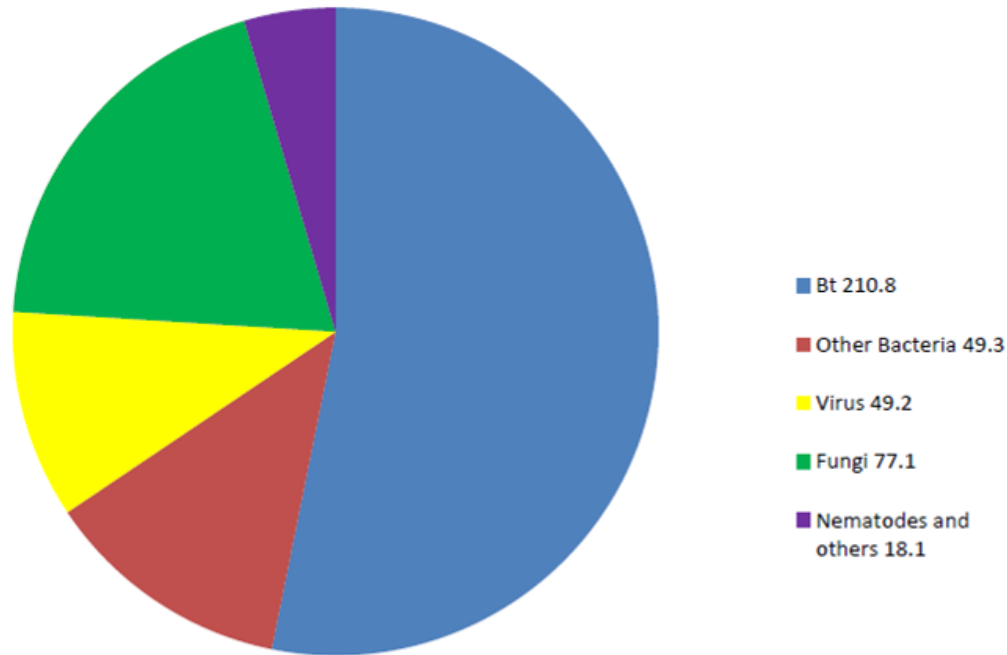


Figura 4. Venta estimada de bioplaguicidas en el mundo en el 2010 (millones de dólares).

(Gráfica tomada de Lacey et al., 2015)

1.3.1 El género *Pantoea* con potencial de especies entomopatógenas

El género *Pantoea* es un grupo bacteriano diverso con morfología de bacilo, Gram negativo y oxidasa negativa; tienen una coloración que puede ser de entre beige a amarillo. Este género perteneciente a la familia Enterobacteriaceae ha sido aislado de distintos ambientes naturales; agua, suelo, plantas, animales y humanos, por lo que se le ha considerado una bacteria ubicua. A la fecha, algunas especies poseen capacidades de interés en la biorremediación, producción de metabolitos con potencial anticancerígeno, antibióticos y dentro del manejo de plagas agrícolas (Walterson y Stavrínides, 2015). Stavrínides et al. (2010) reportaron a la especie *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* como entomopatógena del áfido del chícharo *Acyrtosiphon pisum*. Identificando que el potencial

entomopatógeno de la bacteria se debe a una proteína transmembranal, la cual nombraron *ucp1* haciendo referencia a las palabras en inglés *you cannot pass*. Mediante la deleción del gen, así como su clonación y expresión en *E. coli* BL21, se determinó que este gen era el responsable de la virulencia de la bacteria, ya que esta proteína permite que se adhieran entre ellas formando agregados bacterianos que obstaculizan el intestino del insecto ocasionando con ello la muerte. Por otra parte, la especie *P. deleyi* fue reportada por primera vez en Uganda; siendo aislada de hojas de eucalipto con síntomas de roya bacteriana (Brady et al., 2008). Sin embargo, no se demostró mediante los postulados de Koch su patogenicidad, por lo que se desconoce claramente su rol como parásito. Hasta hoy día, de esta especie se desconocía otro tipo de interacciones en el ambiente y mucho menos su rol de entomopatógeno contra el áfido del sorgo, conocido como pulgón amarillo.

1.4 Toxinas con efecto insecticida contra la familia Aphididae

1.4.1 Proteínas Cry con efecto insecticida contra áfidos

Actualmente, los trabajos reportados en la literatura hacen mención que particularmente estos insectos plaga son poco susceptibles al efecto insecticida de las proteínas de *Bacillus thuringiensis*. La baja toxicidad reportada en áfidos ha sido en bioensayos en los que se han utilizado proteínas del tipo Cry2, Cry3 y Cry4, aunque se dice que se pudo haber sobreestimado su toxicidad, ya que solamente fue utilizado el complejo espora-cristal o únicamente los cristales, pero no fue evaluado el efecto insecticida de las proteínas solubilizadas. Es conocido que el pH del intestino de los áfidos es ácido, por lo que se afecta de manera importante la solubilidad del cristal y por lo tanto se verá reflejado en una baja toxicidad. Estudios *in vitro* con cuatro proteínas Cry (Cry1Ab, Cry3A, Cry4Aa

y Cry11Aa) solubilizadas mostraron efectos importantes en la supervivencia del pulgón verde del guisante (*Acyrtosiphon pisum*), además de retardar el crecimiento de los insectos sobrevivientes. Las proteínas Cry3A, Cry4Aa y Cry11Aa presentaron una mortalidad del 100% en un intervalo de 3 a 6 días de exposición a proteína solubilizada a una concentración de 500 µg/mL; mientras que, la toxina cry1Ab presentó mortalidad del 25% (Porcar et al., 2009). No obstante, el efecto insecticida de las proteínas de *B. thuringiensis* contra los áfidos es muy bajo si se le compara con el obtenido para otros Ordenes como Lepidoptera y Coleoptera. En estos últimos Ordenes concentraciones de proteína total en intervalos de 1 a 3.56 µg/mL son suficientes para obtener la CL₅₀ (Ali y Luttrell, 2009; Park et al., 2009).

Particularmente en áfidos, se cree que la toxicidad se ve disminuida debido al pH ácido del estómago de los insectos; por lo que se ve afectada la solubilización de los cristales proteicos (Chougule y Bonning, 2012). De igual forma, se conoce que las enzimas proteolíticas de los áfidos son del tipo cisteína, caso contrario de Lepidópteros y Coleópteros que poseen proteasas del tipo serina tales como tripsina o quimiotripsina.

1.4.2 Proteínas Cyt con efecto insecticida contra áfidos

En el estudio de Porcar et al. (2009) también se evaluó una proteína Cyt1A, la cual presentó una mortalidad de apenas un 10%. Sin embargo, los áfidos (*A. pisum*) sobrevivientes no llegaron a la madurez debido a que se retrasó su crecimiento, mientras que los insectos control si se desarrollaron hasta adultos.

1.4.3 Proteínas Vip con efecto insecticida contra áfidos

Sattar y Maiti (2011) evaluaron el potencial insecticida de varios aislados de *B. thuringiensis* productores de Proteínas Insecticidas Vegetativas (VIP) contra el áfido del algodón *Aphis gossypii*. Las proteínas binarias identificadas como Vip1Ae y Vip2Ae, fueron clonadas y parcialmente purificadas por cromatografía de intercambio catiónico; para posteriormente evaluar su potencial insecticida, obteniendo una concentración letal cincuenta (CL₅₀) de 0.35 µg/mL. En trabajo de Yu *et al.*, (2011), se clonaron los genes *vip1Ac1* y *vip2Ae3* de la especie de *B. cereus*; los cuales presentaron una elevada toxicidad contra *A. gossypii* con una concentración muy baja de las proteínas binarias, obteniendo una CL₅₀ de 87.5 ng/mL.

Sin lugar a dudas, en la actualidad existe la necesidad de utilizar productos insecticidas biodegradables para el manejo de plagas y enfermedades; los cuales deben de ser inocuos a los organismos no blanco y al medio ambiente. Actualmente, grupos de investigación en el área de control biológico de instituciones académicas e industriales, se han dado a la tarea de buscar nuevas bacterias y metabolitos secundarios que posean potencial insecticida contra las nuevas plagas emergentes en las regiones agrícolas, esperando que estos trabajos den frutos en un futuro próximo para poder llevar a cabo un mejor manejo de estas plagas. Por tal motivo, en este trabajo se plantea como objetivo caracterizar aislados bacterianos patógenos a *M. sacchari*, plaga exótica en nuestro país desde el 2013 y la cual amenaza los cultivos de sorgo no sólo en México sino en Estados Unidos, países que son los mayores productores de este cultivo en el mundo.

1.5 Mecanismo de acción de las proteínas insecticidas

1.5.1 Toxinas Cry y su mecanismo de acción

El modo de acción de las proteínas Cry ha sido elucidado en líneas celulares e insectos del orden Lepidoptera, de los cuales existen dos modelos aceptados que describen el posible modo de acción de estas toxinas.

1.5.2 Modelo de formación de poro

El modelo de formación de poro comprende varias etapas que conllevan a la muerte del insecto, destacando que hasta la unión al receptor cadherina por parte de la toxina el proceso aún puede ser reversible. Sin embargo, una vez que la toxina se inserta en la membrana de las células de las microvellosidades apicales ubicados en el intestino medio, el proceso se vuelve irreversible y por lo tanto es inminente que el insecto muera (Schnepf et al., 1998).

Los cristales proteicos una vez ingeridos por el insecto, son solubilizados mediante las condiciones de pH alcalino del intestino medio del insecto. Ya solubles las proteínas (130 kDa), son expuestas a las proteasas del tipo serina (tripsina, quimiotripsina) del intestino del insecto, cuya actividad proteolítica rompe la proteína a un tamaño de 60 kDa (Pardo-López et al., 2013). La toxina activa se une con baja afinidad a los receptores aminopeptidasa (*APN*) y fosfatasa alcalina (*ALP*), proteínas abundantes en la microvellosidades de la membrana de las células del intestino (Pacheco et al., 2009). La adición a estos receptores facilita que la toxina tenga una gran afinidad a las proteínas cadherina. La unión a los receptores cadherina da origen a una oligomerización por la remoción proteolítica del amino (N) terminal, la α -hélice 1 y parte de la α -hélice 2a. Esta

eliminación de péptidos provoca un cambio conformacional originando una oligomerización de entre 3 o 4 moléculas de toxinas, formando un pre-poro oligomérico necesario para la inserción en la membrana (Gómez et al., 2002; Pardo-López et al., 2013). Este pre-poro oligómero se une con mayor afinidad a los receptores *APL* y *APN* insertándose en la membrana creando los poros (Bravo et al., 2004; Gómez et al., 2006; Pacheco et al., 2009); dicho fenómeno causa un choque osmótico y paulatinamente la ruptura del intestino medio, terminando en la muerte inevitable del insecto (de Maagd et al., 2001).

1.5.3 Modelo de transducción de señales

Este modelo fue propuesto por Zhang et al. (2006), el cual se basa en la transducción de señales en líneas celulares *High five (Trichoplusia ni)*. Aunque este estudio se realizó en la línea celular mencionada, no difiere al modelo de formación de poro con respecto a la etapa de unión de la toxina a receptores de la microvellosidad del intestino. La interacción de la proteína Cry con el receptor cadherina dispara la cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} , activando las proteínas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G) las cuales a su vez activan la adenilil ciclasa promoviendo la producción intracelular de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). El incremento de los niveles de cAMP activa las enzimas quinasas, siendo éstas responsables de la activación de vías de señalización resultando en la muerte celular. En este modelo propuesto en el que ocurre la muerte celular del insecto, acontece sin la participación de estructuras oligoméricas de proteínas Cry que forman los poros líticos, ni de los receptores de anclaje GPI (Zhang et al., 2005 y 2006).

1.5.4 Otros tejidos blanco de proteínas y metabolitos insecticidas

Desde el siglo pasado, la elucidación del modo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* es uno de los mayormente estudiados. No obstante, existen otras especies bacterianas pertenecientes al grupo de las Gram negativas que también producen metabolitos y proteínas con efecto insecticida. El efecto biocida se basa principalmente en tejidos blanco categorizado en tres tipos, neurotoxinas, toxinas digestivas y citotoxinas.

Algunos géneros bacterianos de la familia Enterobacteriaceae tales como *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Yersinia*, sintetizan moléculas con toxicidad vía oral similar a las proteínas Cry. Se sabe que *Photorhabdus* produce las toxinas Mvf, las cuales provocando en las orugas pérdida de turgencia, y rearreglan la actina del citoesqueleto induciendo la apoptosis en hemocitos y células del tejido epitelial (Katrukha et al., 2009). Aunado a esto, también sintetizan unas proteínas conocidas como Pir las cuales al unirse al tejido neuronal lo dañan provocando así la muerte del insecto (Waterfield et al., 2005; Blackburn et al., 2006).

Por otro lado, *X. nematophila* sintetiza toxinas denominadas A24tox las cuales presenta un modo de acción análogo a las toxinas de *Photorhabdus* (Sicard et al., 2003). Así también, se sabe que esta especie produce una molécula llamada Xenocina con actividad RNase y citotóxica, además ayudan a eliminar la competencia microbiana dentro de la larva infectada (Singh et al., 2013). Aunado a esto, se conoce que esta bacteria produce una serie de proteínas tóxicas codificados por distintos genes (*xptA1*, *xptA2*, *xptB1* y *xptC1*), estas llevan a cabo un sinergismo que potencializa la toxicidad contra el insecto blanco (Waterfield et al., 2005). Se ha elucidado que *X. nematophila* sintetiza otras toxinas

relacionadas a la inducción de apoptosis, tales como las toxinas binarias XaxA y XasB. La patogenicidad de estas bacterias ha sido evidenciada en especies de diferente Orden como: Coleoptera, Lepidoptera y Hemiptera (Vigneux et al., 2007).

Por otra parte, el género *Serratia* también tiene especies entomopatógenas tales como *S. entomophila*. Esta especie posee los genes *sepA*, *sepB* y *sepC* similares a los genes Tc de *P. luminescens* y *xtp* de *X. nematophila*; estos genes de acuerdo a su función son categorizados como toxinas y potencializadores de la toxicidad. Su intervalo de hospederos se conoce en los Ordenes de insectos de Coleoptera y Lepidoptera (Hurst et al., 2000; Hurst et al., 2007).

Algunas especies de *Yersinia spp.* también son conocidas por su comportamiento entomopatógeno. En sus plásmidos presentan islas de patogenicidad relacionadas a genes de virulencia, los cuales codifican para quitinasas y proteínas insecticidas de la súper-familia Tc (Tennant et al., 2005; Dodd et al., 2006; Fuchs et al., 2008). Dentro de los daños causados a su hospedero se conoce que éstas toxinas ocasionan hinchazón en las células columnares del intestino, afectando la absorción de nutrientes; síntomas que inducen al insecto blanco a dejar de alimentarse ocasionando la muerte. Su patogenicidad se ha evidenciado contra especies del Orden Lepidoptera y Coleoptera, así como actividad nematocida (Spanier et al., 2010; Hurts et al., 2011).

Sin lugar a duda, el género *Pseudomonas* junto con el de *Bacillus* han aportado al mercado de los bioplaguicidas especies bacterianas de importancia en el control de plagas. *Pseudomonas fluorescens* es una especie ya muy bien conocida en el control biológico de insectos plaga y enfermedades agrícolas. Esta especie produce proteínas insecticidas

llamadas Fit, las cuales afectan directamente al hemocele provocando pérdida de turgencia y melanización, induciendo así la muerte a su hospedero (Péchy-Tarr et al., 2008; Ruffner et al., 2013). La patogenicidad de esta especie es complementada por otros factores de virulencia como lipasas, exotoxinas con actividad hemolítica y tres toxinas del tipo TccC. *Pseudomona entomophila* posee genes del tipo Tcc y TcdB similares a *P. fluorescens*, estos codifican para proteínas proteolíticas y lipasas que destruyen las células del intestino de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Vodovar et al., 2006). Este género afecta a principalmente a especies del Orden Diptera y Lepidoptera.

Las bacterias Gram positivas del género *Clostridium* han demostrado tener potencial como entomopatógenos y su intervalo de hospederos se encuentra en especies del Orden del Diptera y Lepidoptera. *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia* es un claro ejemplo de este género con capacidad insecticida, su potencial se ha demostrado contra larvas de mosquito (Diptera) (Nicolas et al., 1993). Otras especies de *Clostridium* producen una citotoxina B del tipo exotoxina, estas provocan una reorganización del citoesqueleto similares a las Mcf induciendo a la muerte celular mediante apoptosis (Just y Gerhard, 2005). *Clostridium botulinum* produce una toxina denominada C2 que se une a actina, esta proteína puede tener la función de reconocimiento de receptores, además de tener la capacidad de formar poros en la membrana de las células apicales de las microvellosidades del intestino (Aktories et al., 2012).

Otros factores no menos importantes los cuales presenta una elevada virulencia son los metabolitos secundarios tales como las β -exotoxina, un nucleótido análogo de la Adenina, el cual inhibe la biosíntesis de la RNA polimerasa. Su elevada inespecificidad le

permite tener un amplio intervalo de insectos blanco de diferentes Ordenes: Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera y Orthoptera (Obeidat et al., 2012).

Dentro la de la familia Bacillaceae, especies como *B. circulans* y *L. sphaeriscus* producen factores de virulencia durante la fase de crecimiento, toxina conocida como Sphaericolisina (43 kDa). Estudios previos han demostrado su toxicidad contra *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) y *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), elucidando que el efecto biocida es debido a la adición del N-terminal de la proteína al colesterol da la membrana celular. Esta interacción lipo-proteica forma poros que ocasionan rápidamente una parálisis del sistema nervioso central y otros tejidos recubiertos con colesterol, además de inducir hemólisis en los hemocitos (Nishiwaki et al., 2007; Tweten, 2005).

Existen bacterias no sintetizadoras de toxinas y su modo de acción entomopatógeno es mediante proteínas transmembranales, estas les permiten adherirse a la superficie de las células del intestino provocando obstrucción intestinal, afectando la absorción de nutrientes, pérdida del apetito y por último la muerte. Dentro de esas especies se conocen a *P. stewartii* ssp. *stewartii* patógena al áfido del chícharo *A. pisum*, *S. entomophila* y *S. proteamaculans* causantes de la enfermedad del ámbar de *Costelytra zealandica* (Coleoptera) (Stavrínides et al., 2010; Jackson et al., 1993; Hurst et al., 2000).

1.6 Justificación

México es uno de los mayores productores de sorgo a nivel mundial, actividad agrícola que genera una importante derrama económica a los productores mexicanos. No obstante, la presencia del pulgón amarillo en la región productora de sorgo, representa una amenaza latente para los cultivos de esta planta. Recientemente *M. sacchari* demostró ser una plaga muy agresiva causando pérdidas valoradas en millones de dólares. El manejo integrado de esta plaga, propuesto por las dependencias encargadas de la sanidad vegetal, incluye diferentes métodos preventivos, y sólo la aplicación de plaguicidas enfocada directamente al control del pulgón amarillo. Sin embargo, ya hay estudios que demuestran que el uso indiscriminado de insecticidas induce una presión de selección originando poblaciones de insectos resistentes. Cabe destacar que, dentro del manejo integrado de esta plaga propuesto por dichas dependencias, no se ha sugerido el empleo de organismos entomopatógenos como una opción para mantener los niveles poblacionales bajo el umbral de daño económico, esto debido a que no hay alternativas que puedan ser utilizadas por los agricultores, motivo por el cual es necesario caracterizar aislamientos bacterianos patógenos al pulgón amarillo (*M. sacchari*), los cuales puedan en un futuro ser una opción que sea incluida dentro del manejo integrado de esta plaga.

1.6.1 Hipótesis

Los aislados bacterianos obtenidos de cadáveres de *M. sacchari*, presentarán patogenicidad contra este insecto.

1.6.2 Objetivo general

Caracterizar los aislados bacterianos patógenos a *M. sacchari*.

1.6.3 Objetivos específicos

- 1.- Obtener aislados bacterianos a partir de cadáveres de *M. sacchari* colectados en cultivos de sorgo en el Estado de Morelos.
- 2.- Establecer un pie de cría de *M. sacchari* para los bioensayos.
- 3.- Determinar cuál es la mejor dieta y sistema de alimentación para realizar los bioensayos.
- 4.- Determinar qué cepas son patógenas a *M. sacchari* mediante bioensayos.
- 5.- Calcular la CL_{50} de las cepas patógenas a *M. sacchari*.
- 6.- Identificar molecularmente las cepas patógenas a *M. sacchari*.
- 7.- Discernir y secuenciar las proteínas con efecto insecticida.

CAPÍTULO II

Materiales y métodos

2.1 Colecta de cadáveres de *M. sacchari* en cultivos de sorgo del Estado de Morelos

La zona oriente del Estado de Morelos es una de las regiones de la entidad con importancia en el cultivo del sorgo y la de mayor superficie sembrada que abarca varios municipios aledaños como: Axochiapan, Tepalcingo, Temoac, Ayala, Yecapixtla, Cuautla, Jonacatepec, Yautepec, Jantetelco (SIAP, 2014). Además, de que fue la zona con mayores afectaciones por la plaga del pulgón amarillo en el ciclo primavera-verano 2015. Motivo por el cual, se realizó el muestreo en distintos campos de esta zona; colectando plantas de sorgo y material foliar que presentaban colonias de especímenes del pulgón amarillo. Las plantas infestadas se colocaron en recipientes de plástico con tierra; y el material foliar en bolsas de plástico ligeramente humedecidas. Las muestras fueron analizadas el mismo día de la colecta para evitar afectaciones que pudiera ocasionar su almacenamiento.

2.1.1 Aislamiento de bacterias de cadáveres de *M. sacchari*

Empleando el microscopio estereoscópico se visualizaron las colonias del pulgón amarillo ubicadas en el envés de las hojas de sorgo colectadas. Se buscó indicios de pulgones muertos por algún patógeno, tomando aquellos que parecieran necrosados o momificados. Los cadáveres se colocaron en microtubos de 0.5 mL y posteriormente, en campana de flujo laminar a cada tubo se agregaron 400 μ L de medio líquido LB (Luria-Bertani) (Anexo 1.1), y se incubaron a 30 ± 2 °C durante la noche. De este medio líquido se tomó una asada (asa bacteriológica), se sembró en caja Petri con medio LB (agar 17g/L) y

se incubó a 30 ± 2 °C durante toda la noche. Para obtener colonias puras, se utilizó la metodología de agotamiento de estriado. De las colonias puras se tomó una asada y se resembró en caja Petri dejando incubar a 30 ± 2 °C durante 72 h; para tener una mayor cantidad de aislados se seleccionaron aquellos que fueran distintos en color y apariencia morfológica (tipo de borde de la colonia). Cada uno de los aislados obtenidos se nombró con las siglas ET y un número; guardándose cada aislado por triplicado en criotubos. Cada criotubo consiste en 400 µL de glicerol al 60% y 600 µL de medio LB líquido con biomasa bacteriana. Las muestras con glicerol se almacenaron a -20 °C.

2.1.2 Establecimiento del pie de cría de *M. sacchari* en plantas de sorgo (variedad M550)

Plantas jóvenes de sorgo (2 meses) crecidas en invernadero libres de plagas fueron utilizadas para levantar el pie de cría de *M. sacchari*. Del muestreo de follaje con pulgón amarillo se tomaron especímenes y se transfirieron a estas plantas, colocándolas en jaulas hechas con tela de organza (Fig. 5) y puestas en jaulas de 1m³ con malla antiáfidos (Fig. 5). Las plantas se revisaron periódicamente para eliminar algún enemigo natural de los pulgones (depredadores y parasitoides), los cuales pudieran disminuir o acabar con el pie de cría de *M. sacchari*. Cuando ya se tenía una alta densidad poblacional, se introdujeron plantas jóvenes de sorgo libres *M. sacchari* para mantener disponible su fuente de alimentación.

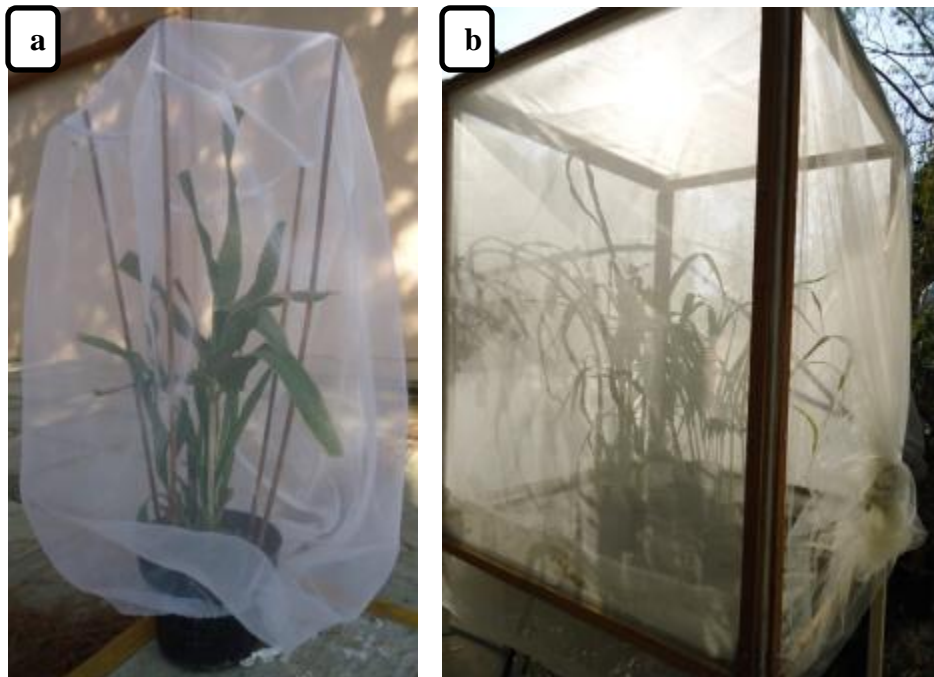


Figura 5. Plantas de sorgo variedad M550. a) Planta de sorgo cubierta con malla de tela de organza donde se colocaron especímenes de pulgón amarillo para el establecimiento del pie de cría. b) Plantas de sorgo en jaula de malla antiáfidos, utilizadas en el establecimiento del pie de cría del pulgón amarillo.

2.2 Selección de aislados bacterianos patógenos a *M. sacchari* mediante bioensayos de patogenicidad

El sistema de alimentación utilizado fue el reportado por Torres-Quintero *et al.* (2013), ya que es fácil de construir y económico (Fig. 6) Brevemente, se pusieron 2 mL de la dieta (Anexo 1.2) en el recipiente, colocando posteriormente la membrana de Parafilm para voltearlo y unirlo con el otro vaso de plástico, al cual se le colocó la tela de organza para impedir que los pulgones escaparán.

Los aislados bacterianos se crecieron en medio HCT (Anexo 1.3) durante 48 h. Una vez esporulado el 80% de las bacterias, fue recuperada en 1 mL de agua destilada estéril, agregando 1mM de PMSF (fenil metanosulfonil fluoruro). La proteína total se cuantificó mediante la técnica de Bradford (1976).

Para determinar cuáles de los aislados eran patógenos a *M. sacchari*, se emplearon tratamientos con una concentración de proteína total de 100 µg/mL adicionada en la dieta. Posteriormente, fueron colocados 15 pulgones en cada uno de los sistemas de alimentación, evaluando la mortalidad cada 24 h durante 5 días. El bioensayo se dejó en incubación a 29 ± 1 °C con una humedad relativa de $70\pm 5\%$. Cada uno de los experimentos se hizo por triplicado con tres repeticiones cada uno, el control negativo fue únicamente la dieta de sacarosa al 30%.



Figura 6. Sistema de alimentación utilizado para los bioensayos de patogenicidad de los aislados bacterianos contra *M. sacchari*.

2.2.1 Determinación de la CL₅₀ de los aislados bacterianos patógenos a *M. sacchari*

De cada uno de los aislados bacterianos que presentaron patogenicidad contra *M. sacchari* se determinó la virulencia. Se emplearon cinco concentraciones de proteína total que oscilaban de entre 1 a 80 µg/mL, esto de acuerdo a la mortalidad obtenida previamente en la determinación de la patogenicidad (100 µg/mL). Así también, se calculó con unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de 2.43×10^7 hasta 4.86×10^8 UFC, conteo realizado mediante diluciones seriadas y sembrado en caja Petri. Los bioensayos se realizaron de la forma ya descrita en el punto anterior. La mortalidad se evaluó cada 24 h hasta los 2 y 3 días. La CL₅₀ fue calculada a partir de los datos obtenidos en los bioensayos mediante un análisis Probit, en el programa estadístico Polo Plus versión 1.0.

2.3 Identificación molecular de la especie de los aislados bacterianos patógenos a *M. sacchari* amplificando los genes marcadores 16S ARNr, *leuS* y *gyrB*

Los aislados bacterianos patógenos a *M. sacchari* se identificaron molecularmente amplificando los genes marcadores 16S ARNr, *leuS* y *gyrB* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés PCR). Las secuencias de ARNr y en especial la del gen 16S ARNr representa el gen blanco más importante en el estudio ecológico y evolutivo bacteriano, incluyendo la determinación de la relación filogenética entre taxa (Větrovský y Baldrian, 2013). Mientras que, el gen leucil-ARNt sintetasa (*leuS*) es reportado como un gen marcador confiable para definir a nivel de especie dentro del género *Pantoea* (Tambong et al., 2014). Por otra parte, se eligió al gen *gyrB* como marcador molecular ya que ha sido reportado como confiable en la diferenciación de especies pertenecientes al grupo de *Bacillus subtilis* (Yamamoto y Harayama, 1995).

Para ello, las cepas fueron sembradas en cajas Petri con medio LB e incubadas durante la noche (overnight) a 29 ± 1 °C. En microtubos de 1.5 mL se colocaron de 50 a 100 mg de biomasa bacteriana, la obtención de ADN se realizó utilizando el kit de extracción de ADN genómico total de acuerdo con el protocolo especificado por el fabricante (Easy DNA™ invitrogen, Ref. 45-0424).

Obtenido el ADN, empleando la técnica de PCR se llevó a cabo la amplificación de los genes marcadores 16S ARN ribosomal y *leuS* para la cepa ET-90, y el marcador *gyrB* para ET-30 y ET-15 en un volumen final de 25 µL (Anexo 1.4). Los iniciadores y las condiciones de PCR utilizados se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Iniciadores y condiciones utilizadas en la PCR para la amplificación de los genes 16S ARNr, *leuS* y *gyrB*.

Par de Iniciadores	Gen	Condiciones de PCR					Tamaño producto (pb)	Referencia
		1 ciclo	34 ciclos			Final		
Pro K63 L1041	16S rARN	95 °C 3 min	95 °C 50 seg	54°C 45 seg	72 °C 1:30 min	72°C 5 min	1400	Lopez et al., 2003
leuS3 leuS4	<i>leuS</i>	95°C 3 min	95°C 50 seg	68°C 1 min	72°C 1 min	72°C 5 min	642	Delétoile et al., 2009
UP-1 UP-2r	<i>gyrB</i>	95°C 3 min	95°C 50 seg	58°C 40 seg	72°C 1:20 min	72°C 5 min	1260	Yamamoto y Harayama, 1995

2.3.1 Secuenciación de los genes de interés 16S ARNr, *leuS* y *gyrB* amplificados por PCR

Los productos de PCR del gen 16S ARNr y *leuS* fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Cuernavaca, Morelos. Para lo cual emplean un secuenciador Applied Biosystems, modelo 3130xl.

2.3.2 Análisis de las secuencias de los genes 16S ARNr, *leuS* y *gyrB*

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de gen 16S ARNr, *leuS* y *gyrB* se compararon con la base de datos del GenBank mediante la herramienta BLAST algorithm (Altschul *et al.* 1990); servicio ofrecido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (siglas en inglés NCBI). Las secuencias se alinearon y compararon con el software bioinformático Mega 7.0. Para elaboración de los respectivos árboles filogenéticos se utilizó el mismo software.

2.4 Solubilización del cristal proteico de las cepas ET-90, ET-30 y ET-15

Las cepas se sembraron en medio HCT e incubaron a 29 °C durante 24 a 72 h. Las bacterias fueron recuperadas en microtubos de 1.5 mL con 1 mL de agua destilada estéril, agregando 10 µL de PMSF (1mM) (fenil metanosulfonil fluoruro). Para retirar la mayor cantidad de biomasa, los microtubos se sometieron tres veces a una centrifugación diferencial a 3500 rpm recuperando en cada una de ellas el sobrenadante.

Por cada 1 mL de sobrenadante se agregó 1 mL de buffer de carbonatos 5M (Anexo 1.5) pH 10.5 ó 40 mM de NaOH, 2990 µL de agua destilada estéril y 10 mM de β-mercaptoetanol. Dejando incubar durante 2 h a 37 °C en agitación. Posteriormente, se

sometió cuatro veces a centrifugación a 3500 rpm, recuperando el sobrenadante en cada una de ellas. Por último, el sobrenadante fue centrifugado a 14000 rpm durante 20 min. Para corroborar la solubilización del cristal proteico, el sobrenadante y la pastilla de células se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE).

2.4.1 Purificación parcial de la proteína mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La purificación de la proteína se llevó a cabo mediante *HPLC* Agilent Technologies 1260 Infinity (*High Performance Liquid Chromatography*), para ello se implementó una columna 5 Diol 300 waters (7.5 x 600 mm) con una fase móvil de PBS 1X (buffer de fosfato salino) y un flujo isocrático de 0.5 mL/min. Previamente a la inyección de la proteína solubilizada en el *HPLC*, la muestra fue filtrada en milipore 0.2µm. Para identificar en que tiempo de retención se encuentran las proteínas de interés, muestras de los diferentes tiempos se resolvieron en gel SDS-PAGE al 10% y posteriormente fueron evaluados en bioensayos de toxicidad para corroborar su efecto biocida contra *M. sacchari*.

2.4.2 Bioensayo de toxicidad con la proteína parcialmente pura

Los bioensayos de toxicidad se realizaron con cada una de las proteínas obtenidas por *HPLC*, para ello se implementó la metodología previamente descrita en el apartado 2.2 de materiales y métodos. Se evaluó de una hasta tres concentraciones de proteína parcialmente pura con respecto la CL_{50} de cada una las cepas que presentaron patogenicidad contra *M. sacchari*.

2.5 Bioensayos de especificidad de la cepa ET-90 contra insectos plaga de diferente Orden

2.5.1 Bioensayos de patogenicidad contra *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae)

La patogenicidad de *Pantoea deleyi* ET-90 se evaluó de acuerdo al sistema de alimentación reportado por Peña-Chora et al., 2006 (Fig. 7). Brevemente, hojas de frijol con pedúnculo fueron cortadas de un área de 4 cm² colocándola sobre papel filtro estéril. Paulatinamente, se colocaron en una caja Petri que contenía una capa delgada de medio agar-agua. De acuerdo a lo obtenido en los bioensayos por ingesta de dieta contaminada, se empleó una concentración de 4 CL₅₀ por cm², esparciendo con pincel la biomasa bacteriana sobre la superficie de la hoja. Después, se colocaron 5 larvas de *E. varivestis* del primer estadio por sistema de alimentación y el control fue sin bacteria. El bioensayo fue incubado a 30°C y revisado cada 24h durante 4 días, el experimento se realizó con 2 réplicas con 4 repeticiones cada una.



Figura 7. Sistema de alimentación empleado para los bioensayos de patogenicidad de la cepa *P. deleyi* ET-90 contra *E. varivestis*.

2.5.2 Bioensayos de patogenicidad contra *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae)

Vasos de plástico fueron utilizados como contenedor de agua para la realización de los bioensayos de patogenicidad contra larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti* (Fig. 8). Se evaluaron dos concentraciones de proteína total de *P. deleyi* ET-90 (10 y 100 $\mu\text{g/mL}$), colocando 10 larvas por cada sistema (vaso) e incubando a 30°C, el control negativo no fue contaminado con bacteria. El control positivo consistió en contaminar el agua con 10 $\mu\text{g/mL}$ de proteína total de la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. El bioensayo fue revisado cada 24h durante 4 días, el experimento se realizó con 2 réplicas con 4 repeticiones cada una.



Figura 8. Sistema empleado en los bioensayos de patogenicidad de *P. deleyi* ET-90 contra larvas de *A. aegypti*.

2.5.3 Bioensayos de patogenicidad contra *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae)

Los bioensayos fueron realizados en un sistema de alimentación reportado por Evans et al. (2009) (Fig. 9). Brevemente, se colocaron 5 mL de la dieta (Anexo 1.6) en el contenedor de plástico y se contaminó con proteína total de acuerdo a la CL_{50} que presentó *P. deleyi* ET-90 contra *M. sacchari* (8.55 $\mu\text{g/mL}$). En cada sistema de alimentación se pusieron diez abejas recién emergidas y se incubó a 30°C, en el control negativo no se contaminó la dieta con bacteria. El bioensayo fue revisado cada 24 h durante 4 días, el experimento se realizó con 2 réplicas con 4 repeticiones cada una.



Figura 9. Sistema de alimentación de abejas, donde el contenedor de plástico de arriba contiene la dieta ingerida por las abejas.

2.6 Determinación de la actividad de enzimas líticas; quitinasas, proteasas y fosfolipasas

La actividad quitinolítica se determinó inoculando una asada bacteriana en un medio de cultivo suplementado con quitina coloidal como fuente de carbono. Brevemente, para un volumen de 100 mL el medio contenía extracto de levadura 0.5g, triptona 1g, NaCl 1g, 1 mL de quitina coloidal al 2% y agar 1.6g. Las cajas se dejaron en incubación a 30 °C durante 4 días, revisando cada 24 h la formación de un halo claro alrededor de la colonia bacteriana, fenómeno indicativo de la actividad quitinolítica.

La actividad proteolítica se determinó inoculando una asada bacteriana en un medio de cultivo suplementado con leche descremada como fuente de nitrógeno. Brevemente, para un volumen de 100 mL el medio contenía extracto de levadura 0.25g, triptona 0.5g, glucosa 0.1g, leche descremada 7g y agar 1.6g. Las cajas se dejaron en incubación a 30 °C durante 4 días, revisando cada 24 h la formación de un halo claro alrededor de la colonia bacteriana, fenómeno indicativo de la actividad proteolítica (Malleswari y Bagyanarayana, 2013).

Las enzimas fosfolipasas se determinaron inoculando una asada bacteriana en un medio de cultivo suplementado con yema de huevo como fuente de carbono. Brevemente, para un volumen de 100 mL el medio contenía extracto de levadura 0.5 g, triptona 1 g, NaCl 1 g, 2 mL de yema de huevo y agar 1.6 g. Las cajas se dejaron en incubación a 30 °C durante 4 días, revisando cada 24 h la formación de un halo claro alrededor de la colonia bacteriana, fenómeno indicativo de la actividad enzimática.

2.6.1 Confirmación por Western blot de la presencia de proteínas del tipo S-layer en la cepa ET-15

Se corrió un gel de poliacrilamida al 10% con diferentes concentraciones de la proteína de interés (0.5 μ g, 0.25 μ g, 0.125 μ g y 0.062 μ g) con el fin de determinar la menor concentración de proteína a la que es sensible el anticuerpo S-layer obtenido a partir del trabajo de Peña-Chora et al. (2006), adicionalmente se incluyendo como control negativo a la toxina CryIab. Las proteínas resueltas se electro-transferieron a una membrana PVDF (03010040001-ROCHE) durante 75 min (300 V y 350 mA) en buffer de transferencia 1X (glicina 14.4 g, Tris base 3.02 g, metanol 200 mL, aforar a 1 L con agua destila). La membrana se bloqueó con BSA (albumina de suero bovino) al 2% en PBS 1X, incubando durante 1 h y se lavó con PBS 1X dos veces durante 15 min. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario α S-layer (1:30 000 en PBS 1X) durante 1 hora; se lavó con PBS 1X adicionado con tween 20 al 0.1% (2 veces, 15 min), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario α -mouse acoplado a peroxidasa (1:100 000 en PBS 1X) (Sta. Cruz Biotechnology) durante 1h. Después, se lavó con PBS 1X (tween al 0.1%) durante 15 min (2 veces), y con PBS 1X durante 10 min. Finalmente, se reveló utilizando el sistema Pierce ECL Western blotting substrate (TermoScientific).

2.7 Transformación de la cepa de *Pantoea deleyi* ET-90 con el plásmido pmCherry-BA y localización en el intestino de *M. sacchari* mediante estereoscopio de epifluorescencia

2.7.1 Preparación de células electrocompetentes de la cepa ET-90

La cepa ET-90 se sembró en medio YEP (30 mL) (Anexo 1.7) dejándose en incubación a 30°C con agitación (200 rpm) durante la noche. Se sometió a centrifugado en tubo Falcón (50 mL) a 3,500 rpm durante 10 min. Posteriormente, en campana de flujo laminar se retiró el sobrenadante y se agregó 20 mL de agua inyectable estéril previamente enfriada (4 °C), haciendo lavados de las células mediante una pipeta de vidrio (10 mL); paso seguido, se volvió a centrifugar a la misma velocidad y tiempo ya mencionado. Este proceso se repitió 4 veces. Por último, se recuperó la pastilla celular en 400 µL de agua inyectable estéril con glicerol al 10%, haciendo alícuotas en microtubos (1.5 mL) a un volumen de 80 µL y guardándolos a -20 °C para su posterior uso.

2.7.2 Transformación de la cepa ET-90 con el plásmido pmCherry-BA mediante electroporación

Para la transformación se tomaron 5 µL de una alícuota de ADN plasmídico (pmCherry-BA) a una concentración de 32 ng/µL y se colocaron en tubo de células electrocompetentes previamente preparadas, homogenizando mediante pipeteo. La mezcla de células y plásmido fue colocada en una celda de electroporación y sometida a choque eléctrico en un electroporador (Eppendorf Multiporator) a 1800 V 5mSeg. Paulatinamente, fueron recuperadas las células de la celda agregando 1 mL de medio líquido LB y

colocándolo en un microtubo de 1.5 mL, esto se dejó en incubación orbital durante 2 h a 30 °C; transcurrida la incubación se tomaron 100 µL y se sembró en caja Petri con medio LB sólido con kanamicina a 50 µg/mL, incubando a 30 °C. Las colonias crecidas a las 24 h y las cuales habían sido transformadas tomaron un color rosa claro. Estas colonias fueron inoculadas en medio líquido YEP (15 mL) con kanamicina 50 µg/mL para obtener mayor biomasa de células transformadas para ser utilizarlas en los bioensayos de localización en el intestino de *M. sacchari*.

2.7.3 Localización de la cepa ET-90 en el intestino de *M. sacchari* mediante estereoscopio de epifluorescencia

El sistema de alimentación y dieta utilizado fue el previamente descrito en los bioensayos de patogenicidad. Brevemente, se contaminó la dieta con 2.14×10^6 UFC/mL de la cepa transformada. Después, fueron colocados 15 pulgones en cada uno de los sistemas de alimentación incubándose a 29 ± 1 °C con una humedad relativa de $70 \pm 5\%$. A las 24 h y 48 h de incubación los especímenes de áfidos fueron llevados al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada UNAM-IBT, para ser disectados los intestinos mediante pinzas de relojero y ser observados en estereoscopio de epifluorescencia (Olympus MacroView MVX10) con filtro para proteínas rojas fluorescentes (*RFP*).

2.8 Estadístico

Los datos de mortalidad fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, comparando las medias mediante el método Holm-Sidak, Sigma Plot 11.0. El nivel de significancia fue con un valor de $P = 0.05$. Letras iguales implica que no hay diferencia significativa entre los valores comparados. La unidad experimental fue de 15 pulgones por sistema de alimentación. Se realizaron 3 réplicas con 4 repeticiones para cada una de las concentraciones de proteína total evaluada. La CL_{50} se obtuvo sometiendo los datos a un análisis Probit mediante el programa Polo Plus versión 1.0.

CAPÍTULO III

Resultados

3.1 Colecta de cadáveres de *M. sacchari* en cultivos de sorgo del Estado de Morelos

El muestreo se realizó en diferentes campos de esta zona hasta cerrar el circuito de muestreo (Fig. 10).

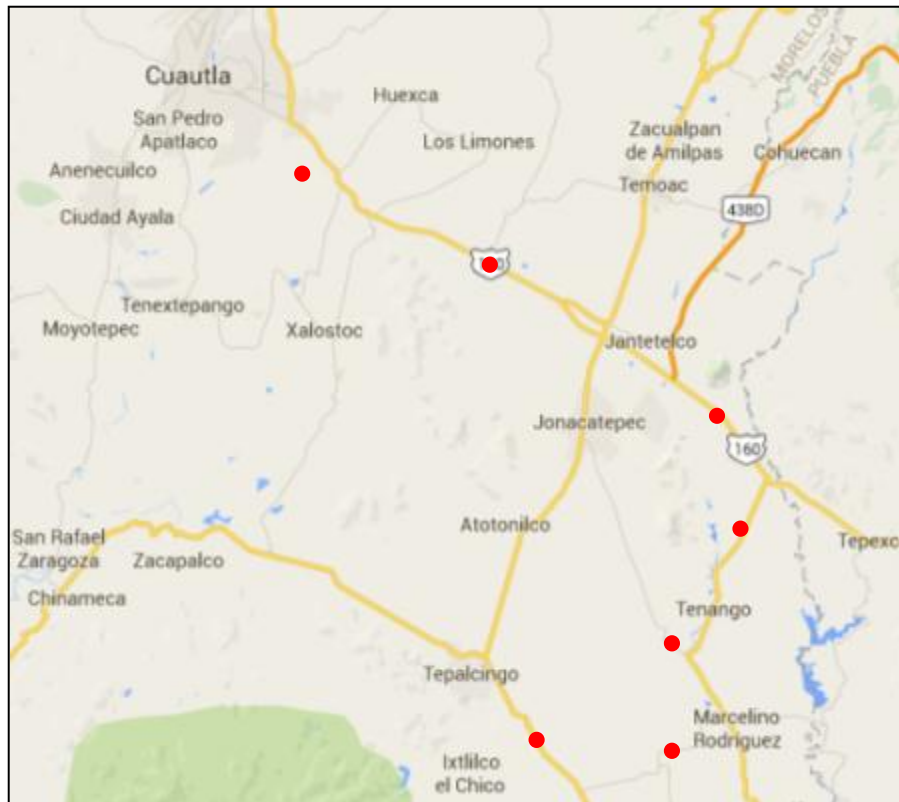


Figura 10. Mapa de la zona oriente del Estado de Morelos donde se realizó la colecta de plantas de sorgo y material foliar infestado por pulgón (los puntos rojos indican el área de la toma de muestras).

La toma de muestras inició en la carretera que lleva a la ciudad industrial de Cuautla, colectando después sobre la carretera federal Cuautla-Izúcar de Matamoros en el kilómetro 88 y a la altura del kilómetro 100. Después, se muestreó en el libramiento a Tenango y en la carretera que va a Tetelilla. También se colectó material vegetal en el camino que va de San Ignacio (Marcelino Rodríguez) a Telixtac. Por último, se recogieron especímenes del pulgón amarillo en cultivos de sorgo ubicados en el cruce que va a Ixtlilco el Grande.

3.2 Aislamiento de bacterias de cadáveres de *M. sacchari*

De todos los muestreos realizados en la zona oriente del Estado de Morelos se obtuvieron un total de 80 aislados bacterianos en medio LB (Luria-Bertani).

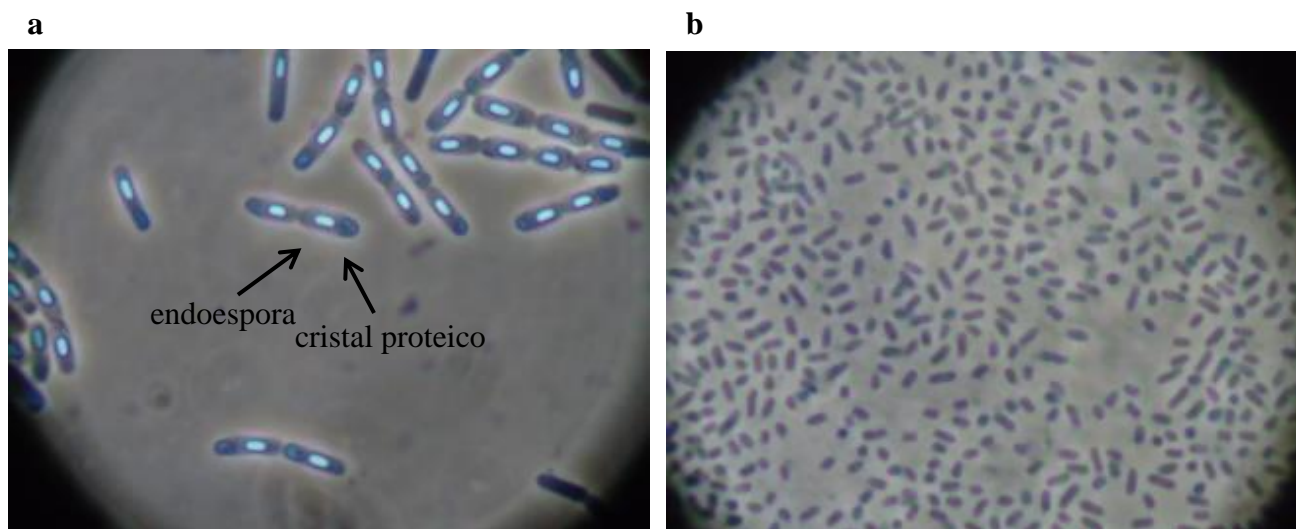


Figura 11. Aislados bacterianos obtenidos de cadáveres de *M. sacchari*. a) Células vegetativas que presentan en su interior la formación de cristales de proteínas y espora, b) Células en forma de bacilo de bacteria no formadora de endoespora.

Las bacterias exhibieron diferentes características morfológicas: tamaño, forma y bordes de colonia, habiendo también colonias de distintos colores: amarillo, blanco, crema, entre otros. Además, los aislados tenían aspectos húmedos o secos y viscosos o duros, con crecimiento de biomasa extendida o limitado solamente a la estría. Alrededor de 20 aislados bacterianos del total presentan características similares al género *Bacillus* spp., debido a la visualización en microscopio óptico a 100X de estructuras celulares formando el complejo espora-cristal proteico (Fig. 11a). Además, se obtuvieron aislados bacterianos no formadores de endoespora (Fig. 11b).

3.3 Establecimiento del pie de cría de *M. sacchari* en plantas de sorgo (variedad M550)

La alta tasa de reproducción de *M. sacchari* aunado a la eliminación de sus enemigos naturales (depredadores y parasitoides) permitió el establecimiento del pie de cría en un lapso de dos meses (Fig. 12).



Figura 12. Plantas de sorgo variedad M550 en jaulas de malla antiáfido, las cuales presentan infestación de las hojas de pulgón amarillo.

3.4 Selección de aislados bacterianos patógenos a *M. sacchari* mediante bioensayos de patogenicidad

De los 20 aislados bacterianos que presentaron cuerpo paraesporal similar a especies del género *Bacillus* se realizó un gel de SDS-PAGE al 10%, para comparar el perfil proteico y realizar bioensayos de patogenicidad con perfiles diferentes; asegurando que se puedan obtener diferentes proteínas con efecto insecticida, las cuales pudieran no estar reportadas en la literatura como tóxicas contra pulgones (Fig. 13).

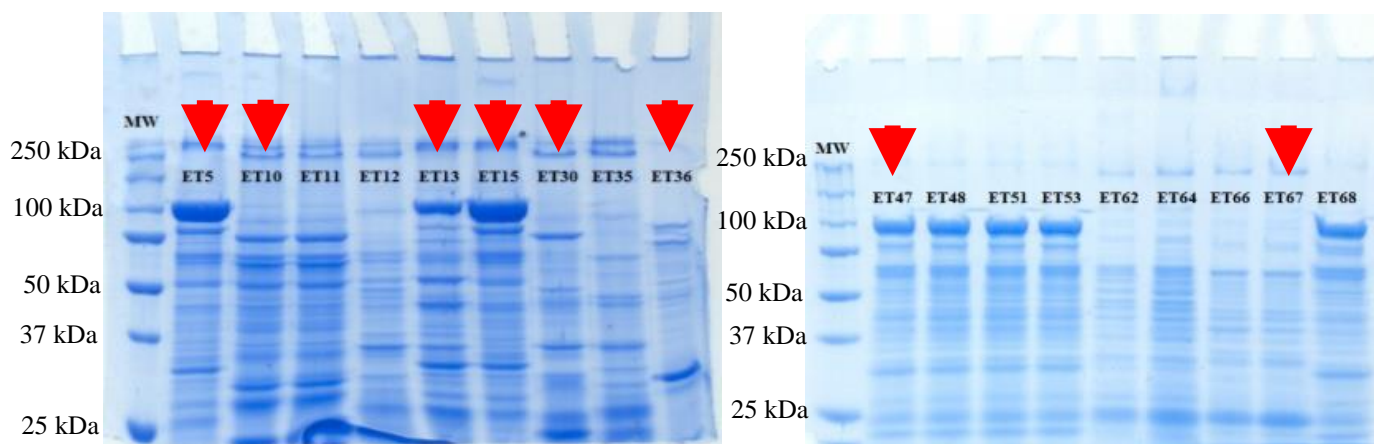


Figura 13. Geles SDS-PAGE al 10%, donde se compara el perfil proteico de las cepas bacterianas aisladas de *M. sacchari*, las cuales presentan características similares al género *Bacillus*. Las flechas señalan diferentes perfiles proteicos observados.

En el bioensayo de patogenicidad la cepa ET-90 presentó mayor virulencia a la concentración de proteína total de 100 µg/mL a las 48 h, con alrededor del 91% de mortalidad de *M. sacchari*. En tanto que, a las 72 h las cepas ET-5, ET-15 y ET-30 presentaron un 60, 66 y 50% de mortalidad, respectivamente (Fig. 14).

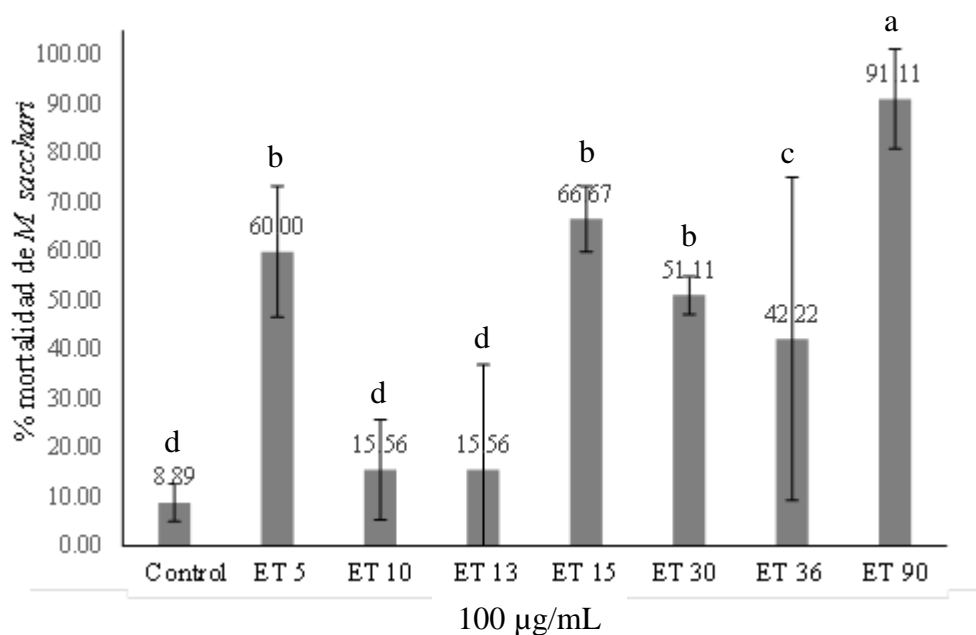


Figura 14. Patogenicidad de las cepas evaluadas contra *M. sacchari* a una concentración de proteína total de 100 µg/mL. Bioensayo a las 48 y 72 h cepa ET-90 y demás cepas, respectivamente. Media de mortalidad con letras diferentes denota diferencia significativa. Comparación múltiple de medias Holm Sidak ($P=0.05$). 1 réplica con 4 repeticiones.

CAPÍTULO IV

Caracterización de la cepa ET-90 patógena a *M. sacchari*

4.1 Determinación de la CL₅₀ de la cepa ET-90

La CL₅₀ de la cepa ET-90 patógena a *M. sacchari* se determinó a partir de una mortalidad que estuvo entre los intervalos del 20 al 80%, esto a partir de 4 diferentes concentraciones de unidades formadoras de colonia (UFC) (Fig. 15).

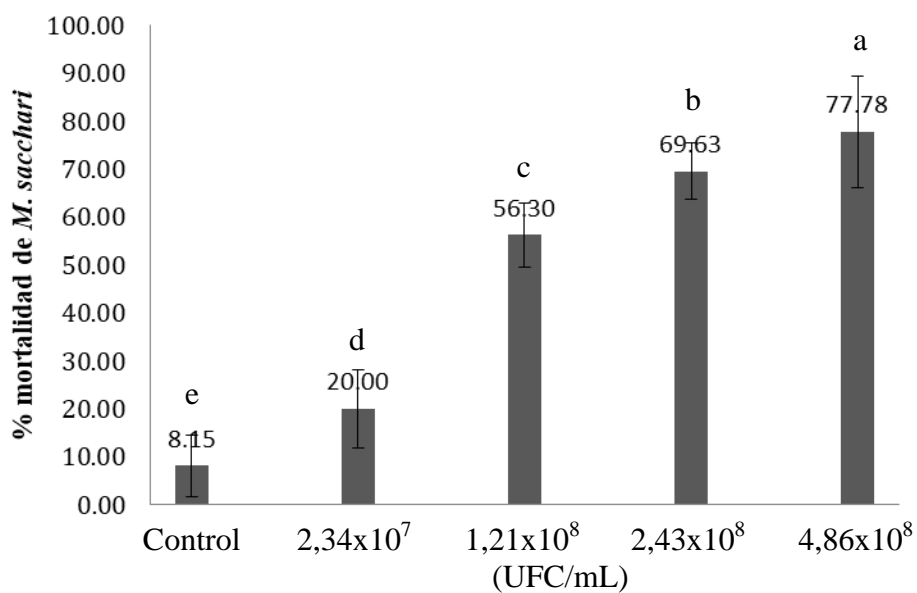


Figura 15. Mortalidad que presentó *M. sacchari* durante la evaluación de 5 diferentes concentraciones de UFC/mL de la cepa ET-90. Media con letras diferentes denota diferencia significativa. Comparación múltiple de medias Holm Sidak ($P=0.05$). 3 réplicas con 4 repeticiones.

Los datos fueron sometidos a un análisis Probit, donde la cepa ET-90 exhibió una CL_{50} de 1.02×10^8 UFC/mL, con límite inferior de 8.16×10^7 UFC/mL y un límite superior de 1.26×10^8 UFC/mL.

4.2 Identificación molecular de la cepa ET-90 mediante los genes marcadores 16S ARN ribosomal y Leucil-ARNt sintetasa (*leuS*)

Mediante la PCR se obtuvieron los amplicones para los genes 16S ARNr y *leuS* de la cepa ET-90. La amplificación del gen 16S ARNr se realizó utilizando los oligos específicos para bacterias reportados por Lopez et al., (2003). El producto de PCR se resolvió en un gel de agarosa al 1% mostrando una banda de aproximadamente 1400 pb para el gen 16S ARNr (Fig.16).

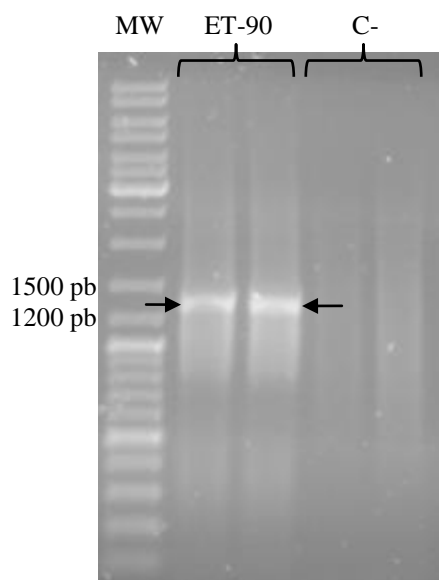


Figura 16. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Amplicón del gen 16S ARNr con tamaño de alrededor de 1400 pb de la cepa ET-90. Control (-) sin ADN.

Con base en el estudio de análisis bioinformático de distintos genes núcleo realizado por Tambong et al., (2014), se eligió el gen *leuS* como marcador molecular; el cual es descrito como marcador confiable para definir a nivel de especie dentro del género *Pantoea*. El amplicón obtenido fue visualizado en gel de agarosa al 1%, viéndose una banda de alrededor de los 700 pb para el gen marcador *leuS* de acuerdo a lo reportado por Delétoile et al., (2009) (Fig. 17).

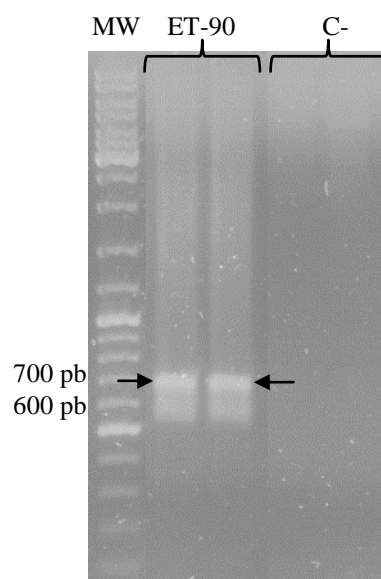


Figura 17. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Amplicón del gen *leuS* con tamaño de alrededor de 642 pb de la cepa ET-90. Control (-) sin ADN.

4.3 Análisis mediante BLAST de las secuencias de nucleótidos del 16S ARN ribosomal y Leucil-ARNt sintetasa (*leuS*)

Las secuencias obtenidas de los genes 16S ARNr y *leuS* fueron analizadas mediante la herramienta *BLAST* del *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*). El gen

16S ARNr de la cepa ET-90 presentó una identidad del 99% a especies del género *Pantoea* (Cuadro 3). Por otra parte, la secuencia obtenida del gen *leuS* mostró una identidad del 99% con la especie *Pantoea deleyi*, seguido de la especie *Pantoea vagans* con un 90% de identidad; este gen marcador demuestra la confiabilidad para diferenciar entre especies del género *Pantoea* de acuerdo a lo reportado en el trabajo de Tambong et al., (2014).

Cuadro 3. Identificación molecular de la cepa ET-90 mediante los marcadores moleculares 16S ARNr y *leuS*.

Cepa	Identificación molecular de la cepa ET-90			
	16S ARNr		<i>leuS</i>	
	No. acceso contra el que se comparó en la base de datos del GenBank	% identidad	No. acceso contra el que se comparó en la base de datos del GenBank	% identidad
<i>Pantoea</i> ET-90	NR116114 <i>P. deleyi</i> strain LMG 24200	99	KF482631 <i>P. deleyi</i> strain LMG 24200	99
	KY486211 <i>P. allii</i> strain RAN-17		CP002206 <i>P. vagans</i> strain C9-1	
	MF101164 <i>P. agglomerans</i> strain GCXG-2			90

4.4 Análisis filogenético de la cepa *Pantoea deleyi* ET-90

Con las secuencias de los genes 16S ARNr y *leuS* se realizó de manera concatenada la elaboración del respectivo árbol filogenético para la cepa ET-90, se utilizó como grupo externo las secuencias de ambos genes (16S y *leuS*) de la especie *Bacillus subtilis subsp. subtilis* cepa 168. En la filogenia de los genes concatenados fue evidente la distancia evolutiva entre las especies de *Pantoea*, constituyéndose ramas y clúster de taxones más distales entre especies (Fig. 18).

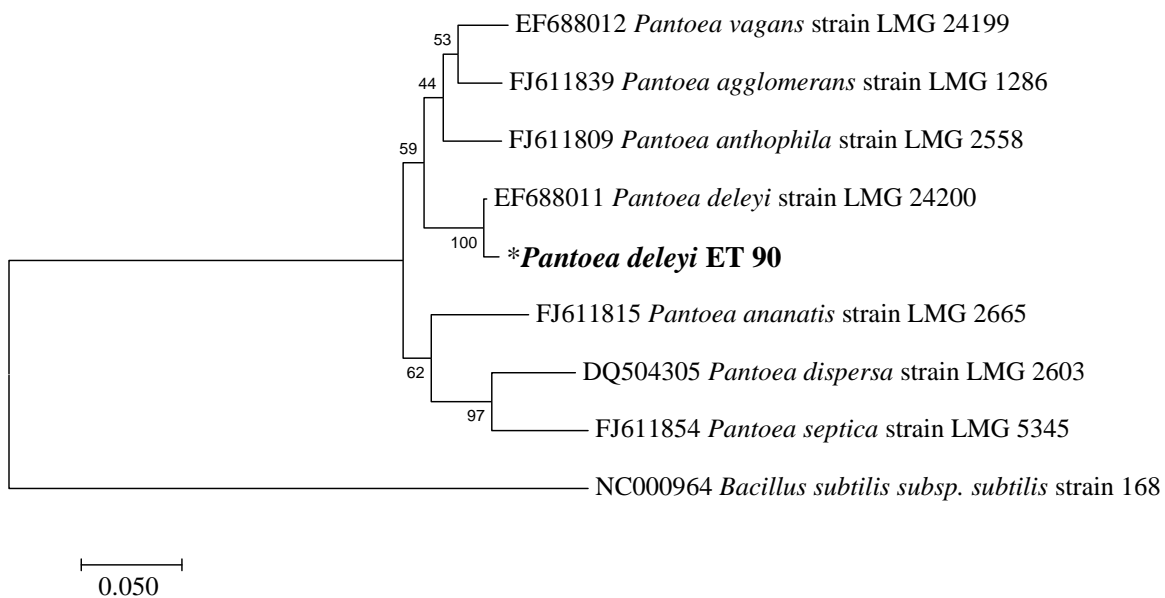


Figura 18. Árbol filogenético concatenado de relación evolutiva de especies del género *Pantoea* mediante los genes 16S ARNr y *leuS*.

La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987). El porcentaje de réplicas del árbol en el cual se asocian los clúster de taxones junto a la prueba Bootstrap (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969), y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. El análisis involucra 18 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Fueron un total de 472 posiciones en el conjunto de datos finales. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

4.5 Solubilización de la proteína mayoritaria de *P. deleyi* ET-90

Solubilizada la proteína mayoritaria de alrededor de 45 kDa en buffer de carbonatos (pH 10.5) esta fue concentrada en tubos Amicon®, dializándola durante 12 h en PBS 1X en membrana (Spectra/Por® 2 Dialysis membrana 12-14 kDa). En el último paso de dializado se observó que hubo una fragmentación de la proteína, ya que se pudo apreciar en el gel SDS-PAGE la aparición de bandas proteicas de menor peso molecular (Fig. 19). La proteína total fue cuantificada mediante la técnica de Bradford obteniéndose una concentración final de 1.14 mg/mL.

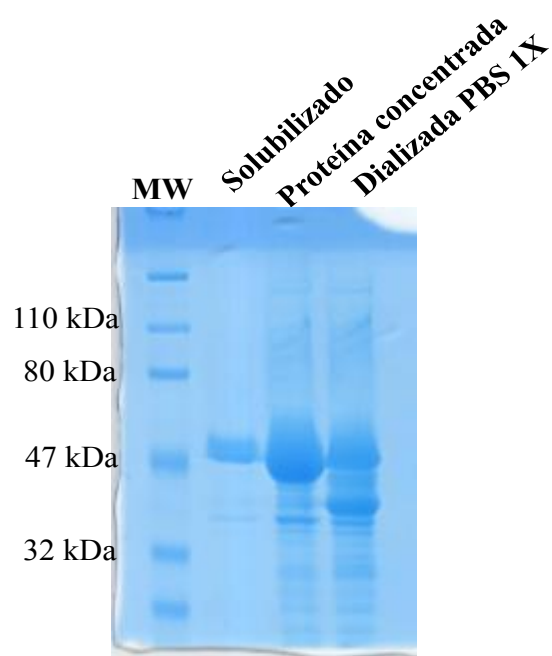


Figura 19. Gel SDS-PAGE al 10% de la proteína mayoritaria de la *P. deleyi* ET-90. Primer carril marcador de peso molecular. Segundo carril proteína mayoritaria solubilizada. Tercer carril misma proteína concentrada mediante tubo Amicon®. Último carril misma proteína dializada.

4.5.1 Purificación parcial de la proteína mayoritaria mediante *HPLC*

La proteína dializada en PBS 1X fue inyectada en el *HPLC* en un volumen de 500 μ L (0.570 mg), con un flujo isocrático de 0.5 mL/min y fase móvil de PBS 1X. En el cromatograma se pudo observar la aparición de un pico a partir del minuto 17.5 el cual fue disminuyendo paulatinamente hasta el minuto 36.2. (Fig. 20a). Las muestras obtenidas en los diferentes tiempos de retención fueron visualizadas en un gel SDS-PAGE al 10% para determinar el minuto en el que se encontraba la proteína mayoritaria de interés. Se observó que en el intervalo de tiempo de 17.5 al 36.2 min, se encontraba la proteína de interés junto con las fragmentaciones que ocasionó la diálisis en PBS 1X realizada previamente (Fig. 20b).

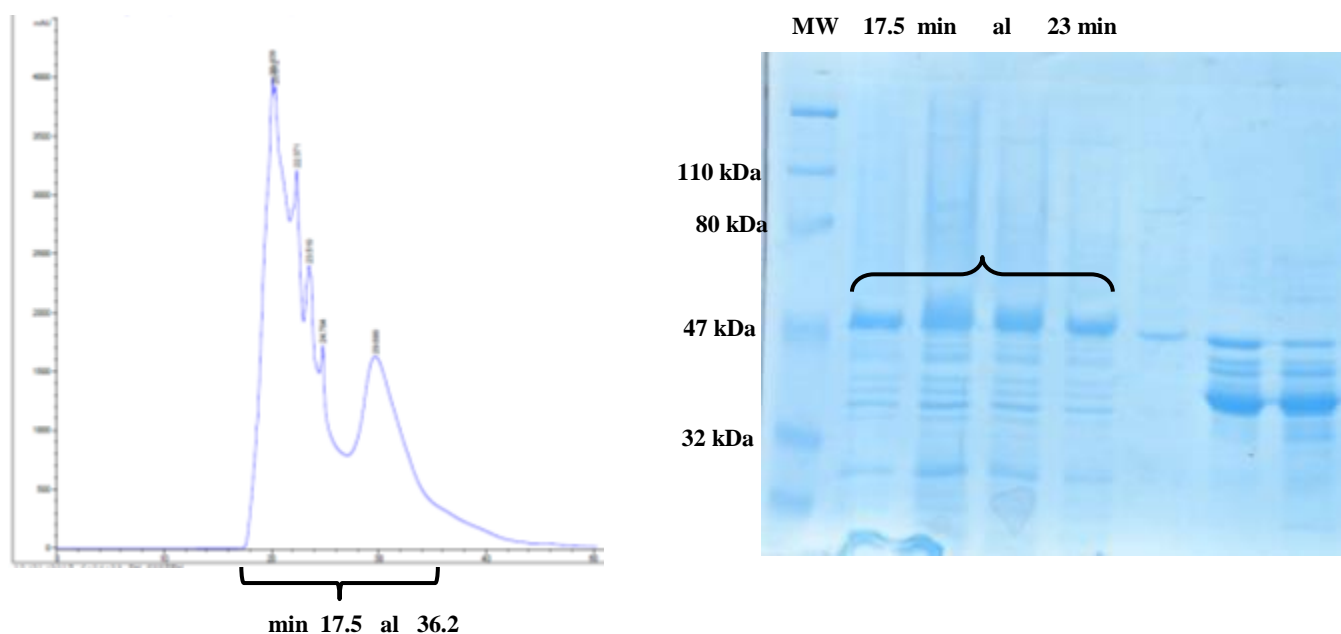


Figura 20. Cromatograma de *HPLC* y gel SDS-PAGE. a) Cromatograma originado a partir de la inyección en *HPLC* de la proteína mayoritaria de la cepa ET-90. b) Gel SDS-PAGE de los diferentes tiempos de retención, obtenidos a partir del min 17.5 al 36.2.

4.5.2 Bioensayo de toxicidad con la proteína parcialmente pura

Empleando proteína parcialmente pura de alrededor de 45 kDa, se realizaron los bioensayos de toxicidad utilizando una concentración de 20 µg/mL utilizando el mismo sistema de alimentación y dieta previamente descrito. Sin embargo, a las 48 h de la evaluación no se observó un efecto biocida hacia los áfidos, motivo por lo que se descartó que la proteína mayoritaria por si sola tiene un efecto insecticida hacia el pulgón amarillo.

4.6 Bioensayos de especificidad de *P. deleyi* ET-90 contra insectos plaga de diferente Orden

4.6.1 Bioensayos de patogenicidad contra *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) y *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae)

Los bioensayos de especificidad demostraron que la bacteria *P. deleyi* ET-90 no es patógena hacia las diferentes especies de insectos evaluados; *E. varivestis*, *A. aegypti* y *A. mellifera*, ya que la mortalidad fue cero en todas las concentraciones de proteína total evaluada; podemos decir que presenta una alta especificidad de hospedero ya que las especies pertenecen a distinto Orden insectil.

4.7 Determinación de la actividad de enzimas líticas; quitinasas, proteasas y fosfolipasas

Durante los 4 días de incubación de la cepa *P. deleyi* ET-90 en el medio de cultivo suplementado con quitina como fuente de carbono, no se visualizó ningún halo claro alrededor de la colonia bacteriana; indicativo de ausencia de actividad quitinolítica. De

igual forma en el medio de cultivo suplementado con leche descremada como fuente de nitrógeno, no se visualizó la formación de halo claro alrededor de la colonia bacteriana; por lo que, enzimas proteolíticas no son producidas por la bacteria. Caso similar se presentó en la evaluación de la actividad de enzimas fosfolipasas, donde no se visualizó halo claro alrededor de la colonia bacteriana (Fig. 21). Dichas evaluaciones cualitativas demuestran que *P. deleyi* ET-90 no produce este tipo de enzimas líticas. La bacteria *Escherichia coli* DH5a se utilizó como control negativo.

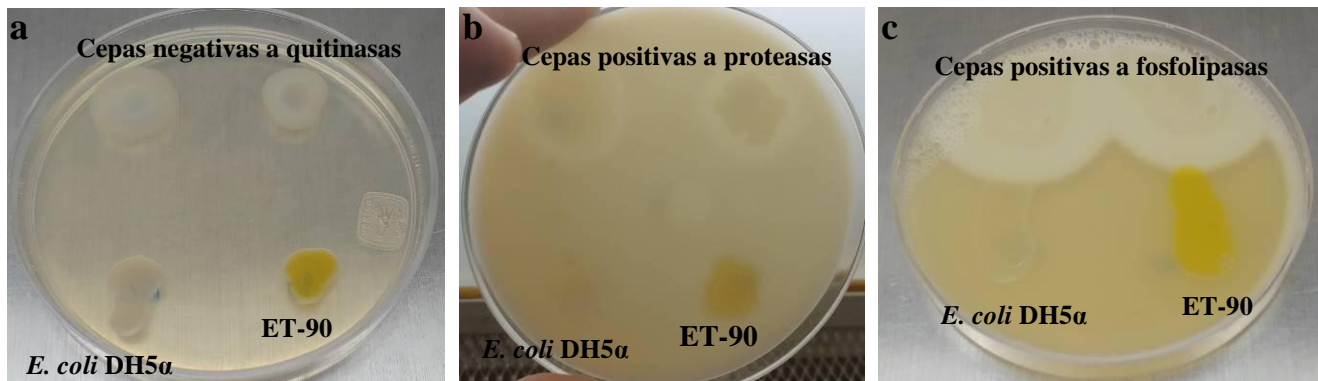
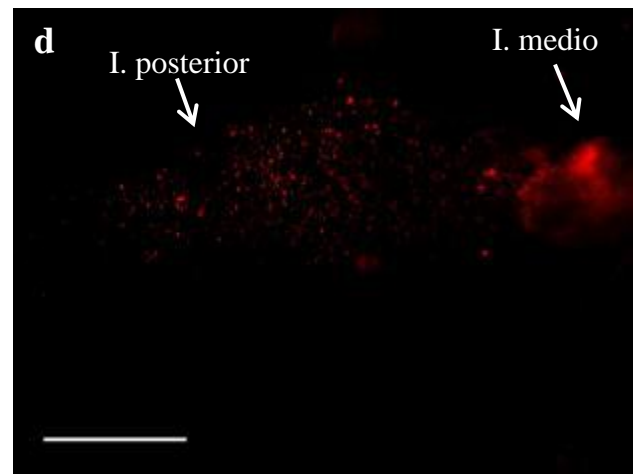
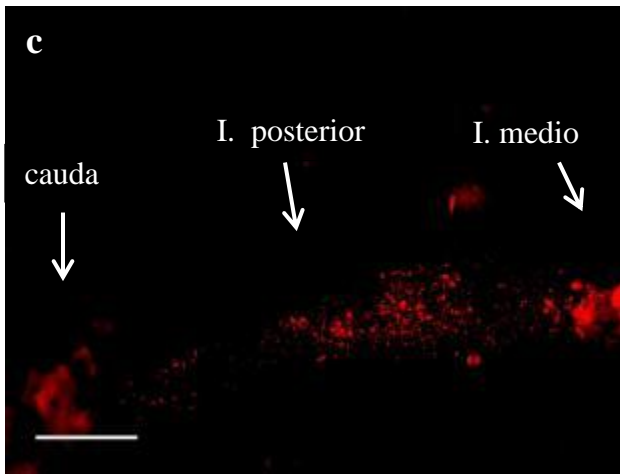
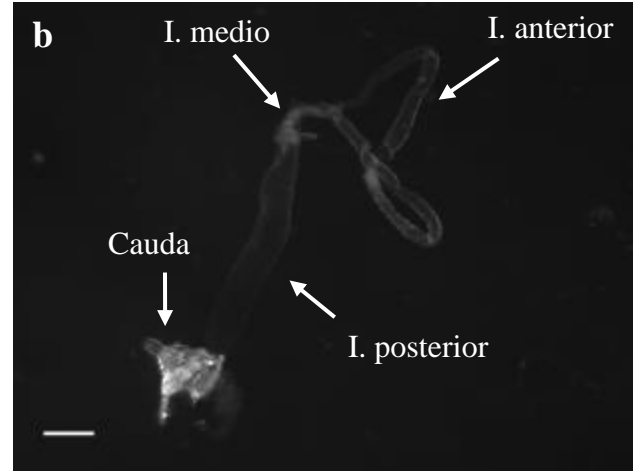
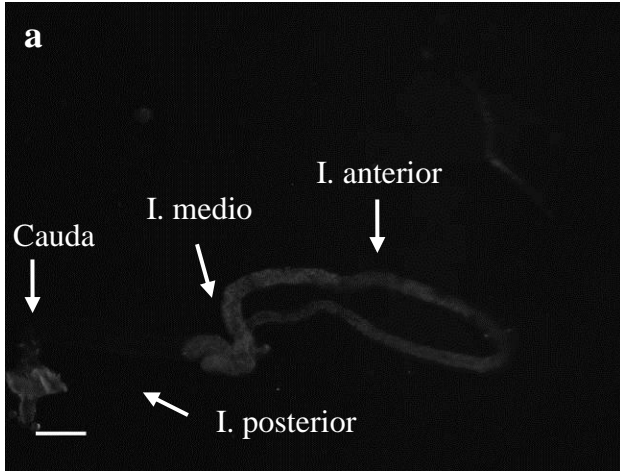


Figura 21. Medios de cultivo suplementados con diferente fuente de carbono y nitrógeno para determinar la producción de enzimas líticas. a) Medio suplementado con quitina para definir si producen quitinasas. b) Medio suplementado con leche descremada para definir si producen proteasas. c) Medio suplementado con yema de huevo para definir si producen fosfolipasas. Un halo claro alrededor de la colonia bacteriana es indicativo de producción de enzimas líticas

4.8 Transformación de la cepa ET-90 con el plásmido pmCherry-BA y su localización en el intestino de *M. sacchari* mediante estereoscopio de epifluorescencia

Durante la observación en estereoscopio mediante luz de lámpara de los intestinos de áfido control (no infectado) y áfido infectado (cepa transformada), no se observaron diferencias estructurales o morfológicas entre ambos (Fig. 22 a y b). Sin embargo, empleando el filtro *RFP* para la localización de la bacteria transformada; pudo observarse diferencias debido a que en los intestinos de los áfidos infectados se visualizaron agregados celulares bacterianos. A las 24 h *P. deleyi* ya formaba pequeños agregados celulares ubicados principalmente en el intesto posterior, además de observarse agregados celulares en el intestino medio (Fig. 22 c y d). Posteriormente, a las 48 h del bioensayo la cepa transformada ya había formado agregados celulares tan grandes que obstruían el intestino del insecto entre el intestino medio y posterior (Fig. 22 e y f), esta obstrucción fue tan crónica que no se visualizaron agregados celulares de la cepa transformada en el intestino posterior del áfido (Fig. 22 g y h). Por otra parte, los áfidos utilizados como control (no tratados con bacteria) no presentaron signos de obstrucción del intestino anterior, medio o posterior, además de no observarse agregados celulares.



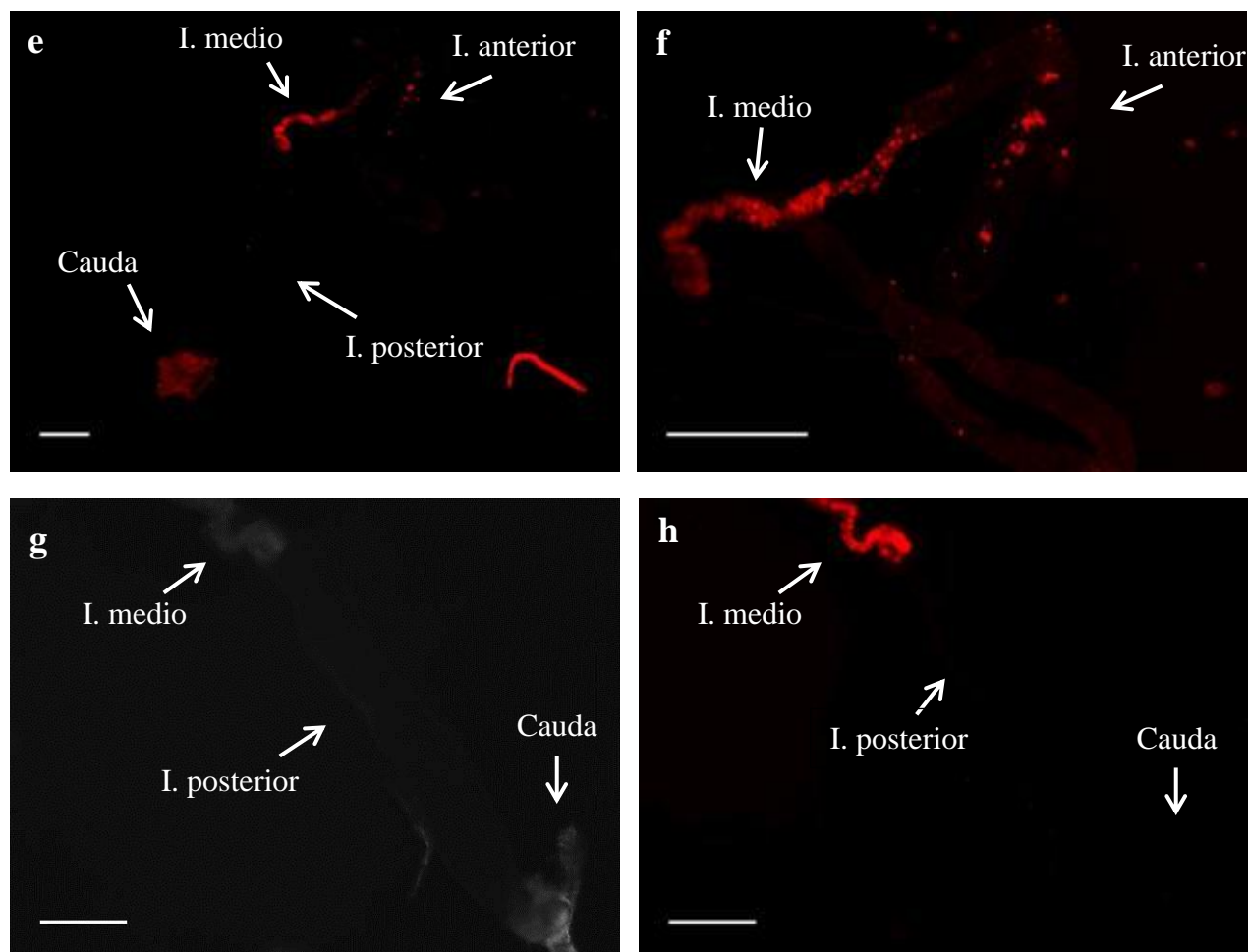


Figura 22. Intestinos de áfidos vistos mediante estereoscopio de epifluorescencia. a) Intestino de áfido no infectado (control) observado con luz de lámpara. b) Intestino de áfido infectado con bacteria transformada observado con luz de lámpara. c y d) Intestino posterior y medio de áfido a las 24 h de infección, se aprecia la presencia de agregados bacterianos (filtro *RFP*). e) Intestino de áfido a las 48 h de infección bacteriana, se observan agregados celulares obstruyendo el intestino medio a la altura de donde comienza el intestino posterior. g) Intestino posterior y medio visto a luz de lámpara a las 48 h de la infección, no se aprecian agregados celulares. h) Fotografía descrita anteriormente vista

mediante filtro *RPF*, aquí se puede apreciar claramente como los agregados bacterianos se localizan en el intestino medio a la altura de donde empieza el intestino posterior; en el intestino posterior ya no se visualizan agregados celulares como a las 24 h de infección. La barra inferior izquierda representa la escala de 200 μm .

CAPÍTULO V

Caracterización de la cepa ET-30 patógena a *M. sacchari*

5.1 Determinación de la CL₅₀ de la cepa ET-30

Los datos de mortalidad de *M. sacchari* obtenidos entre los intervalos del 20 al 80% a partir de 5 diferentes concentraciones de proteína total (Fig. 23), se sometieron a un análisis Probit, donde la cepa ET-30 exhibió una CL₅₀ de 32.09 µg/mL, con límite inferior de 26.64 µg/mL y un límite superior de 38.23 µg/mL.

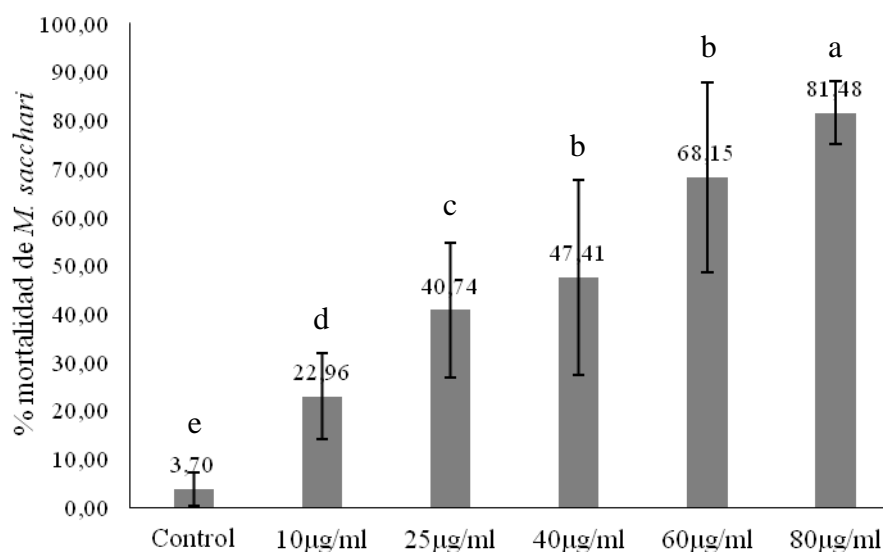


Figura 23. Mortalidad que presentó *M. sacchari* durante la evaluación de diferentes concentraciones de proteína total de la cepa ET-30. Media con letras diferentes denota diferencia significativa. Comparación múltiple de medias Holm Sidak ($P=0.05$). 3 réplicas con 4 repeticiones.

5.2 Identificación molecular de la cepa ET-30 mediante el gen marcador *gyrB*

Mediante la técnica de la PCR se obtuvieron los amplicones para el gen de la cepa ET-30. Esta amplificación se realizó utilizando los oligos del gen *gyrB* reportados por Yamamoto y Harayama (1995), trabajo en el cual determinan que este gen permite diferenciar especies dentro del género *Bacillus*, principalmente las pertenecientes al grupo de *Bacillus subtilis*. El producto de PCR se corrió en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green, mostrando una banda de aproximadamente 1260 pb (Fig. 24), de acuerdo a lo reportado en el estudio de Yamamoto y Harayama (1995).

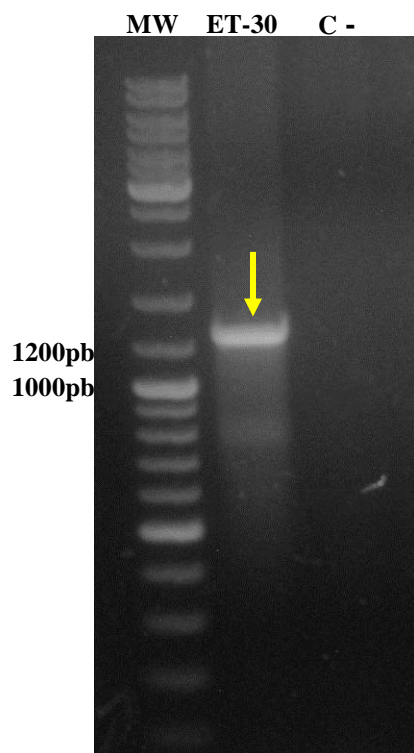


Figura 24. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green. Amplicón del gen *gyrB* con tamaño de alrededor de 1260 pb de la cepa ET-30. Control (-) sin ADN.

5.3 Análisis mediante BLAST de la secuencia de nucleótidos del gen *gyrB*

La secuencia de nucleótidos del gen *gyrB* fue analizada mediante la herramienta BLAST del NCBI, presentando la cepa ET-30 una identidad del 99% con las especies *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Identificación molecular de la cepa ET-30 mediante la secuencia del gen *gyrB* como marcador molecular.

Cepa	Identificación molecular de la cepa ET-30 <i>gyrB</i>	
	No. acceso contra el que se comparó en la base de datos del GenBank	% identidad
<i>Bacillus</i> ET-30	CP019230 <i>B. thuringiensis</i> strain YGd22-03	99
	CP016595 <i>B. cereus</i> strain K8	

5.4 Análisis filogenético de la cepa *Bacillus* ET-30

La secuencia de nucleótidos de dichas especies se utilizó para llevar a cabo el alineamiento, comparación y elaboración del respectivo árbol filogenético; introduciendo como grupo externo la secuencia del gen *gyrB* de la especie *Pantoea ananatis* cepa LMG 2676. La gran identidad genómica de estas especies bacterianas pertenecientes al grupo conocido como *Bacillus cereus sensu lato* ubicó a todas las cepas dentro del mismo clúster de taxones en el árbol filogenético (Fig. 25).

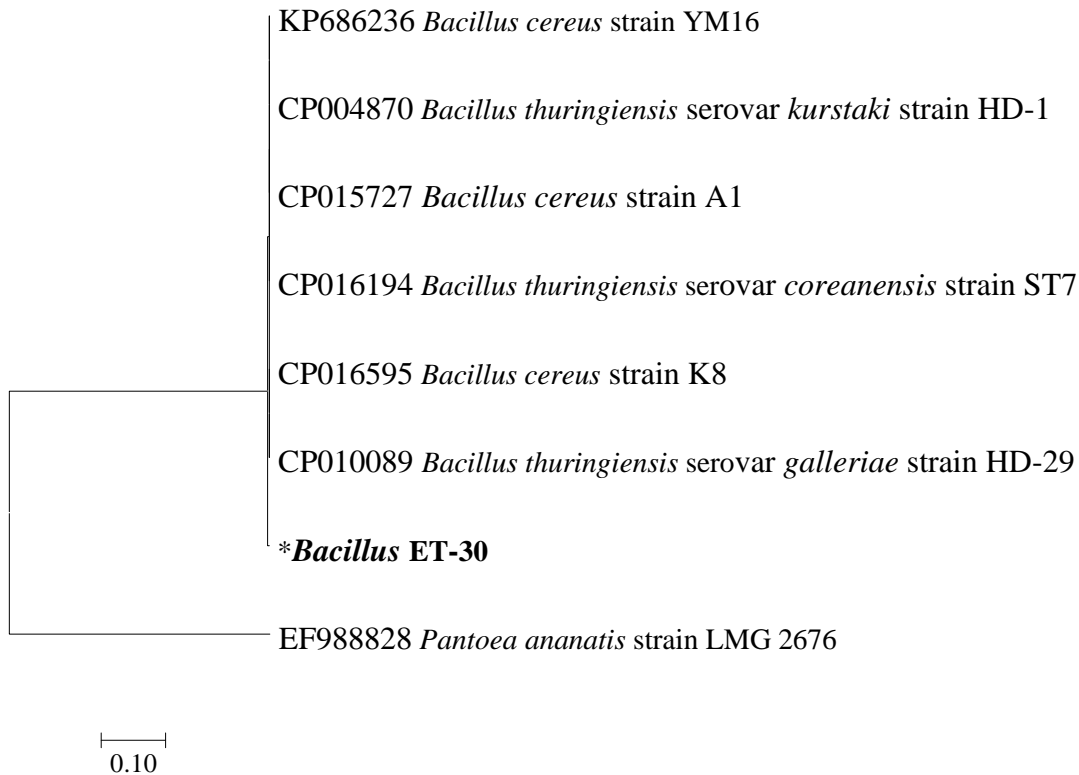


Figura 25. Árbol filogenético de relación evolutiva de especies bacterianas del grupo *Bacillus cereus sensu lato* mediante el gen *gyrB*.

La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987). El porcentaje de réplicas del árbol en el cual se asocian los clúster de taxones junto a la prueba Bootstrap (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969), y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. El análisis involucra 8 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos.

Fueron un total de 472 posiciones en el conjunto de datos finales. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

5.5 Solubilización de la proteína mayoritaria de *Bacillus* ET-30

El complejo espora-cristal y el solubilizado en buffer de carbonatos (pH 10.5) se corrió en gel SDS-PAGE al 10%, se pudo observar que en el solubilizado había varias bandas proteicas de diferentes kDa. La primera banda proteica presentó un peso molecular de alrededor de 85 kDa, otra banda proteica tuvo un peso aproximado de 45 kDa seguida de otra de aproximadamente unos 30 kDa, una última banda siendo la proteína mayoritaria fue visualizada cerca de los 22 kDa (Fig. 26).

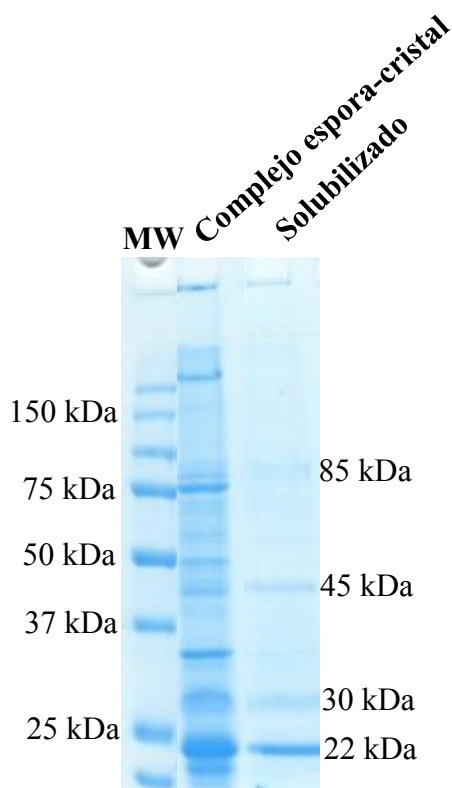


Figura 26. Gel SDS-PAGE al 10% del complejo espora-cristal y solubilizado de *Bacillus* ET-30. Primer carril marcador de peso molecular. Segundo carril complejo espora-cristal. Tercer carril proteína solubilizada.

5.6 Bioensayo de toxicidad con la proteína solubilizada

Los bioensayos con proteína solubilizada se realizaron a una concentración de 20µg/mL, estos fueron llevados a cabo empleando el mismo sistema de alimentación y dieta previamente descrito en materiales y métodos. Sin embargo, durante los 3 días de evaluación no se observó algún efecto biocida contra *M. sacchari*, por lo que se descarta que el complejo proteico sea el agente causal de la muerte del áfido.

5.7 Determinación de la actividad de enzimas líticas; quitinasas, proteasas y fosfolipasas

Durante los tres días de incubación de *Bacillus* ET-30 en el medio de cultivo suplementado con quitina como fuente de carbono, no se visualizó ningún halo claro alrededor de la colonia bacteriana; fenómeno que es indicativo a actividad quitinolítica. Por otra parte, en el medio suplementado con leche descremada como fuente de nitrógeno se visualizó la formación de un halo claro en torno a la colonia bacteriana; fenómeno observado por la acción de las proteasas producidas por la bacteria (Fig. 27a). Caso similar se presentó en la evaluación de la actividad de enzimas fosfolipasas, donde se observó un halo claro junto a la colonia bacteriana (Fig. 27b); demostrando con ello la producción de dichas enzimas. Estas evaluaciones cualitativas señalan que *Bacillus* ET-30 produce

proteasas y fosfolipasas; enzimas líticas asociadas a la virulencia de bacterias entomopatógenas.

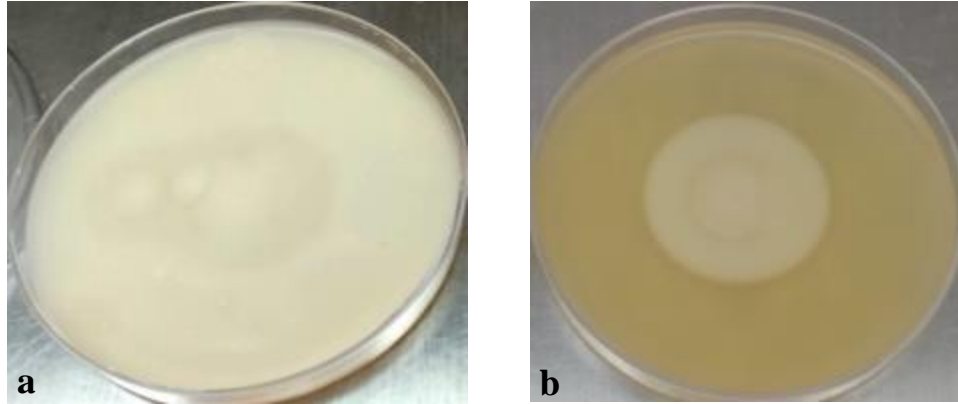


Figura 27. Medios de cultivo suplementados con diferente fuente de carbono y nitrógeno para determinar la producción de enzimas líticas. a) Medio suplementado con leche descremada para definir si producen proteasas. b) Medio suplementado con yema de huevo para definir si producen fosfolipasas. Un halo claro alrededor de la colonia bacteriana es indicativo de producción de enzimas líticas.

CAPÍTULO VI

Caracterización de la cepa ET-15 patógena a *M. sacchari*

6.1 Determinación de la CL₅₀ de la cepa ET-15

Los datos de mortalidad de *M. sacchari* obtenidos entre los intervalos del 20 al 80% a partir de 4 diferentes concentraciones de proteína total (Fig. 28), se sometieron a un análisis Probit, donde la cepa ET-15 exhibió una CL₅₀ de 49.3 µg/mL, con límite inferior de 40.61 µg/mL y un límite superior de 59.81 µg/mL.

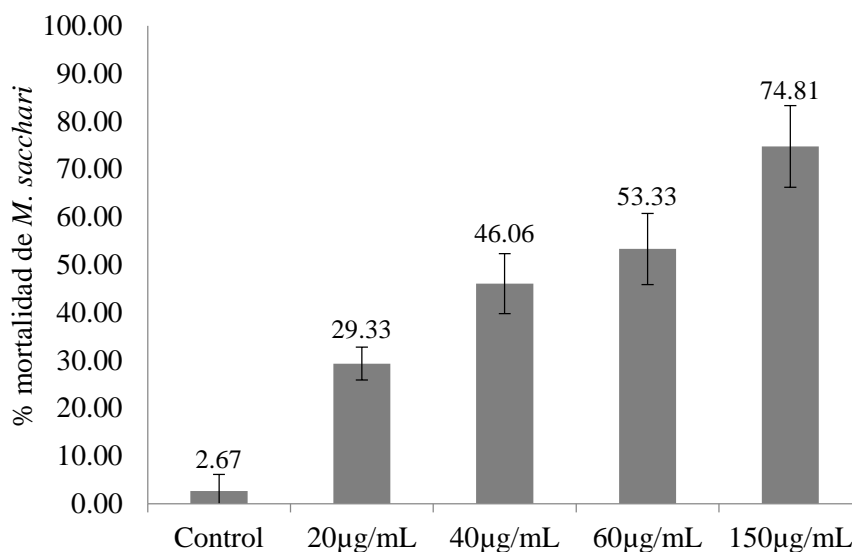


Figura 28. Mortalidad presentada por *M. sacchari* utilizando cinco concentraciones diferentes de proteína total de la cepa ET-15. Media con letras diferentes denota diferencia significativa. Comparación múltiple de medias Holm Sidak ($P=0.05$). 3 réplicas con 4 repeticiones.

6.2 Identificación molecular de la cepa ET-15 mediante el gen marcador *gyrB*

Mediante la técnica de la PCR se obtuvieron los amplicones del gen de interés de la cepa ET-15. Esta amplificación se realizó por medio de los oligos del gen *gyrB* reportados previamente por Yamamoto y Harayama (1995), trabajo en el que se determinó que este gen permite diferenciar especies dentro del género *Bacillus*, principalmente las especies bacterianas pertenecientes al grupo de *Bacillus subtilis*. El producto de PCR que se obtuvo se corrió en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green, visualizándose una banda de aproximadamente 1260 pb de acuerdo a lo reportado por Yamamoto y Harayama (Fig. 29).

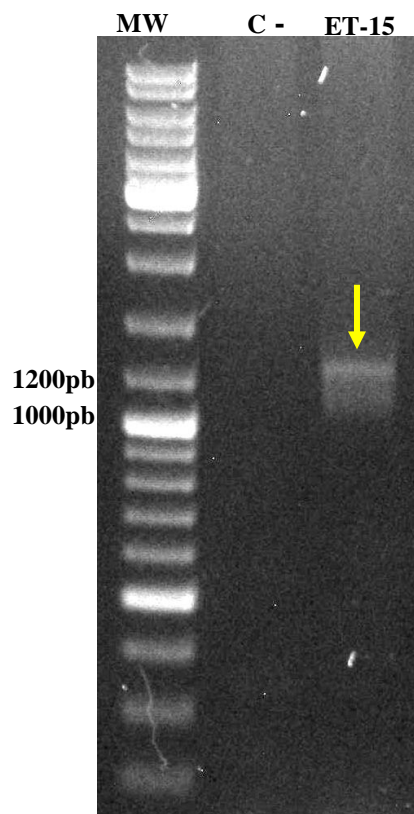


Figura 29. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green. Amplicón del gen *gyrB* con tamaño de alrededor de 1260 pb de la cepa ET-15. Control (-) sin ADN.

6.3 Análisis mediante BLAST de la secuencia de nucleótidos del gen *gyrB*

La secuencia de nucleótidos del gen *gyrB* fue analizada mediante la herramienta BLAST del NCBI, presentando la cepa ET-15 una identidad del 99% a las especies del género *Bacillus*; *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Identificación molecular de la cepa ET-15 mediante la secuencia del gen *gyrB* como marcador molecular.

Cepa	Identificación molecular de la cepa ET-15 <i>gyrB</i>	
	No. acceso contra el que se comparó en la base de datos del GenBank	% identidad
<i>Bacillus</i> ET-15	CP020723 <i>B. thuringiensis</i> strain BM-BT15426	
	CP003187 <i>B. cereus</i> strain F837/76	99
	CP023001 <i>B. anthracis</i> strain 14RA5914	

6.4 Análisis filogenético de la cepa *Bacillus* ET-15

La secuencia de nucleótidos del marcador molecular *gyrB* de la cepa ET-15 fue comparada en la base de datos del GenBank mediante la herramienta BLAST del NCBI, dando una identidad del 99% con distintas cepas de las especies de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*; la secuencia de nucleótidos de dichas especies fue utilizado para llevar a cabo el alineamiento, comparación y elaboración del respectivo árbol filogenético; utilizando como grupo externo la secuencia del gen *gyrB* de la especie *Pantoea ananatis* cepa LMG 2676. La gran identidad genómica de estas especies

bacterianas pertenecientes al grupo conocido como *Bacillus cereus sensu lato* ubicó a todas las cepas dentro del mismo clúster de taxones en el árbol filogenético (Fig. 30).

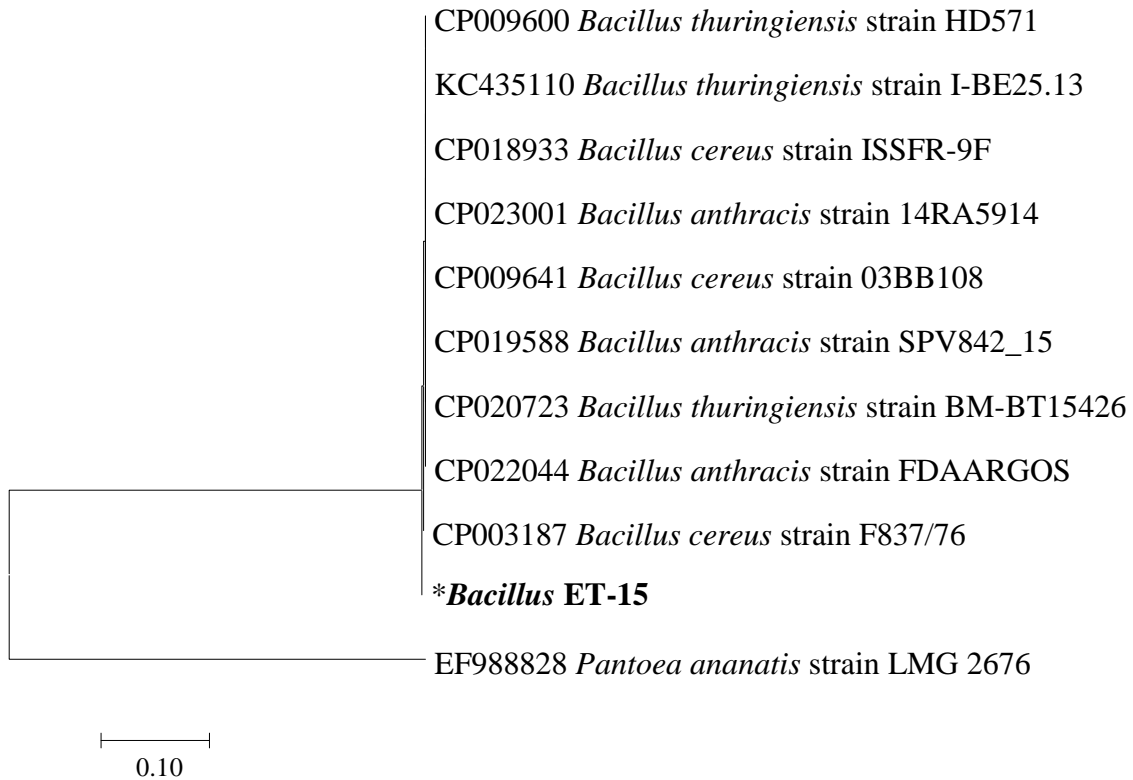


Figura 30. Árbol filogenético de relación evolutiva de especies del género *Bacillus* mediante el gen *gyrB*.

La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987). El porcentaje de réplicas del árbol en el cual se asocian los clúster de taxones junto a la prueba Bootstrap (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969), y están en las

unidades del número de sustituciones de base por sitio. El análisis involucra 11 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Fueron un total de 472 posiciones en el conjunto de datos finales. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

6.5 Solubilización de la proteína mayoritaria de *Bacillus* ET-15

El complejo espora-cristal y el solubilizado en buffer de carbonatos (pH 11.6) se corrió en gel SDS-PAGE al 10%, se pudo observar en el solubilizado una banda proteica mayoritaria de 100 kDa la cual corresponde a lo previamente observada en el complejo espora-cristal (Fig. 31).

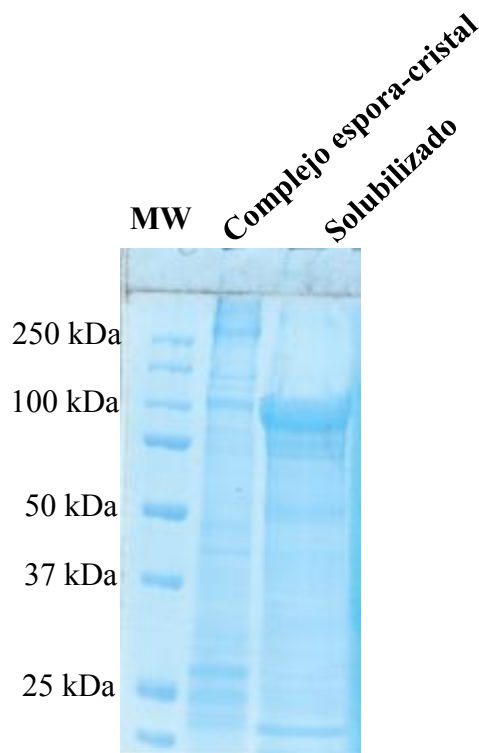


Figura 31. Gel SDS-PAGE al 10% de la proteína mayoritaria de la *Bacillus* ET-15. Primer carril marcador de peso molecular. Segundo carril complejo espora-cristal. Tercer carril proteína solubilizada de 100 kDa.

6.6 Bioensayo de toxicidad con la proteína solubilizada

A partir de este solubilizado se realizó un bioensayo preliminar de toxicidad a una concentración de 30 µg/mL, la ejecución de este experimento se llevó a cabo mediante el uso del mismo sistema de alimentación y dieta previamente descrito en materiales y métodos. Sin embargo, durante los 3 días de evaluación no se observó algún efecto biocida contra *M. sacchari*, demostrando con ello que la proteína mayoritaria de 100 kDa no está relacionada a la muerte del áfido.

6.7 Determinación de la actividad de enzimas líticas; quitinasas, proteasas y fosfolipasas

La evaluación cualitativa de enzimas líticas se determinó que a los tres días de incubación de *Bacillus* ET-15, en el medio de cultivo suplementado con quitina como fuente de carbono no se visualizó ningún halo claro alrededor de la colonia bacteriana; fenómeno que es indicativo a actividad quitinolítica. Por otra lado, en el medio suplementado con leche descremada como fuente de nitrógeno se notó la formación de un halo claro junto a la colonia bacteriana; fenómeno que señala la acción de proteasas producidas por la bacteria (Fig. 32a). En la evaluación de la actividad de enzimas fosfolipasas, se observó un halo claro en torno a la colonia bacteriana (Fig. 32b); demostrando con ello la producción de dichas enzimas. Estas evaluaciones cualitativas

indican que *Bacillus* ET-15 sintetiza proteasas y fosfolipasas; enzimas líticas relacionadas a la virulencia en bacterias entomopatógenas.

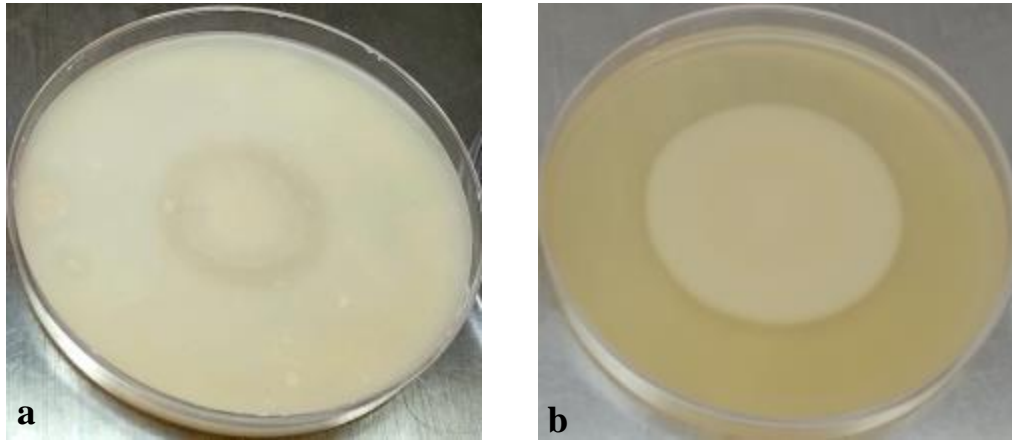


Figura 32. Medios de cultivo suplementados con diferente fuente de carbono y nitrógeno para determinar la producción de enzimas líticas. a) Medio suplementado con leche descremada para definir si producen proteasas. b) Medio suplementado con yema de huevo para definir si producen fosfolipasas. Un halo claro alrededor de la colonia bacteriana es indicativo de producción de enzimas líticas.

6.8 Confirmación por Western blot de la presencia de proteínas del tipo S-layer en la cepa ET-15

La proteína mayoritaria de 100 kDa de *Bacillus* ET-15 fue analizada mediante Western blot para confirmar si pertenecía a proteínas del tipo S-layer. El anticuerpo monoclonal generado previamente en el trabajo de Peña-Chora et al. (2006), reconoció proteínas del tipo S-layer presentes en la membrana PVDF. El anticuerpo usado mostró sensibilidad hasta en la concentración más baja de proteína (0.062 μ g) empleada en la

prueba inmunoquímica (Fig. 33). Por otra parte, el control negativo confirmó la especificidad del anticuerpo hacía las proteínas del tipo S-layer, demostrando la confiabilidad del anticuerpo para reconocer este tipo de proteínas. En las concentraciones más elevadas de proteína utilizada (0.5 μg y 0.25 μg), se observó otras bandas inferiores a 100 kDa; este fenómeno pudiera ser debido a la fragmentación de la proteína mayoritaria o la existencia de otras de menor peso molecular (Fig. 33).

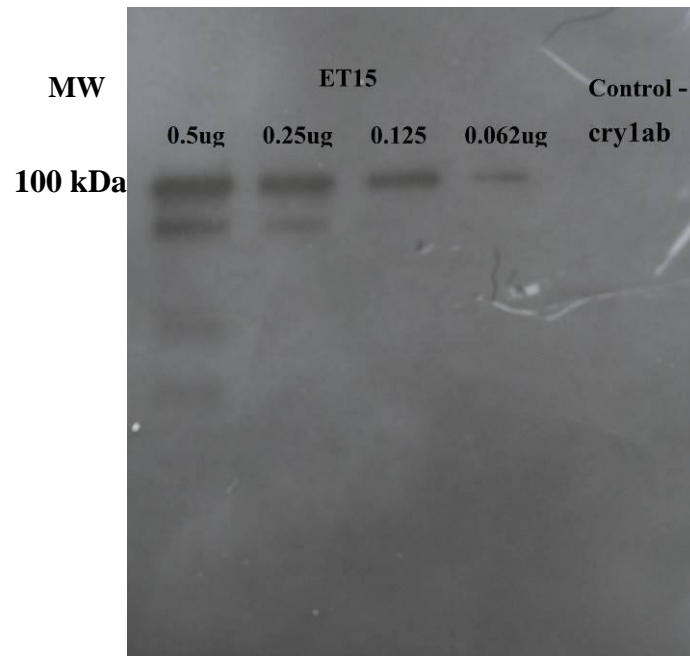


Figura 33. Placa fotográfica de revelado del Western blot. En los carriles del 1 al 4 se muestran las concentraciones de proteína utilizada en la prueba inmunoquímica. Último carril control negativo Crylab.

CAPÍTULO VII

Discusión

Melanaphis sacchari se ha convertido en una plaga para los cultivos de sorgo de Estados Unidos y México, representando una amenaza latente para ambos países. En años recientes quedó demostrada su gran capacidad destructiva ocasionando pérdidas valoradas en billones de dólares (Rodríguez del Bosque y Terán, 2015; Bowling et al., 2016; Zapara et al., 2018). El potencial agresivo del pulgón amarillo fue observado en octubre del 2015 durante los muestreos realizados en cultivos de sorgo en la zona oriente del Estado de Morelos, donde se pudo apreciar una pérdida total de los cultivos de sorgo en los 7 puntos de colecta de especímenes de *M. sacchari*.

De los cadáveres de *M. sacchari* colectados en los muestreos, se obtuvieron bacterias del grupo de las Gram negativas y Gram positivas; de estas últimas se aislaron cepas que presentan características similares al género *Bacillus*, visualizándose estructuras conocidas como esporangios donde se pudo observar el complejo-espora cristal. De las bacterias no formadoras de endoespora (Gram negativas) solo se visualizaron pocas mediante microscopio, algunas de las cuales presentaron formas del tipo bacilo. En el trabajo de Torres-Quintero et al., (2016) reportan un total de 40 cepas del género *Bacillus* aisladas de cadáveres de distintos insectos del Orden Hemiptera, cepas que después fueron evaluadas contra el pulgón del melocotonero *Myzus persicae*. Con respecto a bacterias Gram negativas aisladas de cadáveres áfidos, Hasimoto (2002) reportó haber obtenido 437 cepas, las cuales evaluó contra tres especies de áfidos *Aulacorthum solani*, *Aphis gossypii* y *Myzus persicae*.

Por otra parte, el uso de dietas artificiales ha jugado un papel muy importante en la realización de bioensayos con el objetivo de encontrar nuevas moléculas o toxinas, así como organismos que sean capaces de ocasionar la muerte de insectos plaga. En la familia Aphididae varias dietas han sido desarrolladas y utilizadas en estudios toxicológicos, fisiológicos y de comportamiento, así como en endosimbiosis, transmisión de virus, mortalidad y nutrición (Hunter y Hsu, 1999). Sin embargo, para *M. sacchari* no hay trabajos de dietas desarrolladas para implementarlas en algún estudio. La realización de estudios *in vitro* empleando dietas artificiales con intereses de búsqueda de moléculas u organismo con potencial biocida contra plagas, requieren un tiempo de entre 2 a 7 días (Liu et al., 2002). La dieta de sacarosa al 30% utilizada en este trabajo nos permite tener una supervivencia de *M. sacchari* en un 87% al décimo día de evaluación (Toledo-Hernández et al., 2018), tiempo suficiente para la evaluación de toxinas, moléculas u organismos entomopatógenos de interés para el manejo del pulgón amarillo (Sabtharishi y Naveen, 2017; Torres-Quintero et al., 2016; Han et al., 2014). Esperamos que el desarrollo de esta dieta facilite la realización de estudios enfocados a la búsqueda de moléculas u organismos entomopatógenos contra este insecto plaga, los cuales se puedan introducir como una opción más dentro del manejo integrado de este áfido.

Aunado a las dietas artificiales, la búsqueda y selección de bacterias entomopatógenas tienen un rol muy importante en el descubrimiento y desarrollo de productos con potencial para el control biológico de plagas. Entre los casos de éxito de especies comercializadas en el área de bioplaguicidas tenemos a *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B.*

thuringiensis subsp. *galleriae*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* entre otros (Arthurs y Dara, 2018), bacterias que han demostrado ser patógenas a insectos de distintos Ordenes; Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera, Orthoptera, Hymenoptera, Mallophaga, Rhabditida; así como de la Clase Gastropoda y Arachnida (Palma et al., 2014; de Maagd et al., 2003; Alquisira-Ramírez et al., 2014).

En este trabajo se evaluaron 7 cepas aisladas de cadáveres de *M. sacchari*, determinando que 4 de estas fueron patógenas al áfido presentando una mortalidad de entre 60 a 90%. La cepa identificada como ET-90 demostró ser más virulenta con respecto a las del género *Bacillus* (ET-15 y ET-30), ocasionando hasta un 90% de mortalidad del áfido a las 48 h con una concentración de 100 µg/mL de proteína total, con una CL₅₀ mediante UFC de 1.02×10^8 . Cabe destacar que la identificación molecular de la cepa ET-90 de acuerdo que la secuencia obtenida del gen *leuS* dio una identidad del 99% con la especie *Pantoea deleyi*, seguido de un 90% de identidad de la especie *Pantoea vagans*; este gen marcador demuestra la confiabilidad para diferenciar entre especies del género *Pantoea* de acuerdo a lo reportado en el trabajo bioinformático de Tambong et al., (2014). Con respecto a bacterias patógenas a áfidos pertenecientes al género *Pantoea*, Hashimoto (2002) reporta por primera vez a *Pantoea agglomerans* como entomopatógena a tres especies de áfidos *A. solani*, *A. gossypii* y *M. persicae*; patogenicidad que fue determinada a través de la atomización del sobrenadante del cultivo y vía per-oral a una concentración de 10^9 UFC, alcanzando una mortalidad de entre 100 a 70%, respectivamente. Aunado a especies del mismo género, Stavrinides et al. (2010) demuestran en su trabajo que la especie *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* es patógena al áfido *Acyrtosiphon pisum*. La

patogenicidad fue asociada a una proteína transmembranal perteneciente a la familia de proteínas conocidas como *RHS* (rearrangement hotspot proteins), la cual denominaron *ucp1* (*you cannot pass*); dicha proteína facilita que se adhieran las células bacterianas entre ellas formando conglomerados, dando origen al taponamiento u obstrucción del intestino, afectando la absorción de nutrientes, pérdida del apetito y por último la muerte del áfido en un tiempo de 72 h. Estos agregados bacterianos formados por *P. stewartii* fueron vistos únicamente en el intestino posterior del áfido de acuerdo a las fotografías presentadas en el trabajo de Starivnides et al. (2010). Caso similar presentó la especie *P. deleyi* contra *M. sacchari*, observándose a las 48 h de la infección bacteriana conglomerados celulares entre el intestino medio y posterior del áfido; dicho fenómeno pudiera estar relacionado a la patogenicidad de la bacteria contra *M. sacchari*.

Teniendo en cuenta que la patogenicidad de las especies *P. stewartii* y *P. deleyi* está asociada a la proteína transmembranal que les permite formar agregados celulares que inducen a la obstaculización del intestino del insecto, se pensaría que dicho fenómeno se pudiera reproducir en los intestinos de otros insectos. Sin embargo, los bioensayos de especificidad contra *E. varivestis*, *A. aegypti* y *A. mellifera* demostraron que *P. deleyi* presenta especificidad hacia su hospedero *M. sacchari*. A la fecha, no hay estudio que evidencien el modo o mecanismo que limita la patogenicidad de las especies *P. stewartii* y *P. deleyi* hacia insectos de otros Ordenes de insectos.

En mismo trabajo de Hashimoto (2002) se reporta otras especies de bacterias Gram negativas como entomopatógenas a los áfidos *A. solani*, *A. gossypii* y *M. persicae*. Actualmente, es el único que ha reportado la especie *Xanthomonas maltophilia* como

patógena de insectos de la familia Aphididae; mortalidad determinada por medio de la atomización de sobrenadante del cultivo y vía per-oral a una concentración de 10^{10} UFC. De igual forma, encontró que una cepa de *Pseudomonas fluorescens* presentaba patogenicidad contra las tres especies de áfidos. Identificando por medio de *HPLC* (cromatografía líquida de alta resolución) seguida de espectrometría de masas por pulverización iónica (MS), que la molécula biocida correspondía al biosurfactante conocido como Viscosina; biomolécula que ya había sido reportado como antimicrobiano y antiviral, pero no se conocían sus propiedades insecticidas (Hashimoto, 2002).

Los aislados identificados como pertenecientes al género *Bacillus* debido a la visualización en microscopio del complejo espora-cristal, dos cepas etiquetadas como ET-30 y ET-15 presentaron patogenicidad contra *M. sacchari*, y los cuales fueron identificadas molecularmente mediante el gen *gyrB*. Marcador molecular elegido debido a que el grupo de *Bacillus cereus sensu lato* no puede ser diferenciado por medio del gen 16S del ARN ribosomal, sino sólo mediante genes *cry*; Yamamoto y Harayama (1995) reportó al gen *gyrB* como confiable en la diferenciación de especies pertenecientes al grupo de *Bacillus subtilis*; motivo por el que se decidió secuenciar el gen *gyrB*. En trabajo de Torres-Quintero et al. (2016) obtuvieron bacterias aisladas de cadáveres de insectos del Orden Hemiptera y concernientes a la especie *Bacillus thuringiensis*. Su estudio consistió en un tamiz de patogenicidad con aproximadamente 40 cepas bacterianas de *B. thuringiensis* contra el áfido del melocotonero *Myzus persicae*, encontrando que 17 cepas eran patógenas mediante la ingesta de proteína total (10 ng/ μ L), ocasionando la mortalidad del áfido de hasta en un 88% a las 72 h. En relación a la patogenicidad de nuestras cepas ET-30 y ET-15

identificadas dentro del grupo *Bacillus cereus sensu lato*, la mortalidad fue determinada hasta las 48 h post-infección, ocasionando la cepa ET-30 una mortalidad de *M. sacchari* de hasta un 81% con 80 µg/mL, en tanto que, para la cepa ET-15 fue de un 74% con 150 µg/mL.

La evaluación biocida de la proteína mayoritaria solubilizada de las cepas ET-30 y ET-15 en las concentraciones empleadas demostró no ser tóxica al áfido. Sin embargo, aunque no podrían estar directamente relacionadas a la mortalidad del insecto, no se puede descartar su relación en la virulencia de la bacteria. A través de pruebas cualitativas se determinó que estas cepas producen proteasas y fosfolipasas, enzimas líticas asociadas a la virulencia de especies bacterianas entomopatógenas, dichas enzimas junto con el cristal proteico podrían aumentar la virulencia de la bacteria ocasionando la muerte del áfido (Harrison y Bonning, 2010; Julian et al., 1973). Dentro del género *Bacillus* es conocido el papel que juegan los diferentes factores de virulencia en la mortalidad de los insectos. La especie *Bacillus thuringiensis* es una de las más estudiadas dentro de los microorganismos de control biológico de plagas, se sabe que además de ejercer su patogenicidad mediante las δ -endotoxinas Cry y Cyt sintetiza otras moléculas que potencializan su virulencia matando al hospedero en menos tiempo. Dentro de estos factores de virulencia se han reportado las proteasas (metalloproteasas), α -exotoxinas (fosfolipasas C), β -exotoxinas (nucleótido análogo de la adenina).

Se sabe, que dentro de las funciones que pueden presentar las proteasas, es la hidrólisis de los péptidos antimicrobianos secretados por el sistema inmune del hospedero; así como la desintegración de la mucina, barrera formada por glicoproteínas en la

membrana peritrófica del intestino del insecto (Fang et al., 2009; Raymond et al., 2010). En estudio de Fedhila et al. (2002), demuestran la importancia de la metaloproteasa (InhA2) en el incremento de la virulencia de *Bacillus thuringiensis* cuando el insecto es infectado a través de la vía oral.

Aunado a los factores de virulencia, existen reportes de cepas de *B. cereus* como patógena a insectos de los Ordenes Coleoptera, Hymenoptera y Lepidoptera (Heimpel, 1967). El primer trabajo reportado de una enzima soluble fosfolipasa C, fue el de Toumanoff (1953), quien sugirió que esta enzima podría estar involucrada en la patogénesis. Más tarde, Heimpel (1955) corrobora esa hipótesis evaluando la cepa *B. cereus* Frankland y Frankland contra la mosca de la sierra del alerce *Pristiphora erichsonii* (Hymenoptera: Tenthredinidae). De acuerdo a Heimpel (1967), las cepas de *B. cereus* que producen fosfolipasas en cantidades suficientes causa cambios fisiológicos en el intestino del insecto, dejándolo susceptible y facilitando la entrada de bacterias al hemocele causándole una septicemia y posteriormente la muerte. Con base a los estudios mencionados sobre proteasas y fosfolipasas, podemos argumentar que la virulencia de nuestras cepas de *Bacillus* ET-30 y ET-15 está relacionada a la producción de estas dos enzimas líticas durante la patogénesis ocasionada al pulgón amarillo *Melanaphis sacchari*.

En la actualidad, las dependencias de sanidad vegetal de Estados Unidos y México requieren una colaboración conjunta para buscar alternativas que mantengan a la plaga debajo del umbral de daño económico, evitando con ello nuevos brotes que vuelvan a comprometer la sanidad de los cultivos. La generación de conocimiento sobre organismos patógenos a *M. sacchari* es un área a explorar con el fin de ofrecer nuevas opciones al

control de la plaga, evitando con ello un nuevo impactando en la producción y rendimiento que particularmente se ven reflejados en la economía de los productores.

Conclusiones

- ❖ Cuatro de siete cepas aisladas de cadáveres de *M. sacchari* fueron patógenas al insecto plaga.
- ❖ La diversidad bacteriana encontrada incluye los dos grandes grupos bacterianos, Gram negativas y Gram positivas, observando también bacterias formadoras de endoesporas y no formadoras.
- ❖ El sistema de alimentación reportado por Torres-Quintero et al. (2013) junto con la dieta de sacarosa al 30%, son la mejor opción para la realización de estudios toxicológicos, ya que permiten hasta un 87% de supervivencia del áfido al décimo día.
- ❖ La cepa *P. deleyi* ET-90 presentó mayor virulencia con respecto a las cepas de *Bacillus* ET-15 y ET-30, con una mortalidad de alrededor del 90% a las 48h a una concentración de proteína total de 100 µg/mL.
- ❖ En todas las cepas el efecto insecticida no está asociado a la proteína mayoritaria o cristal proteico.
- ❖ De acuerdo a lo visto por microscopia, la virulencia de *P. deleyi* ET-90 está asociada a la formación de conglomerados celulares, fenómeno que obstruye el intestino del insecto y el cual pudiera estar relacionado con la patogenicidad de esta especie.
- ❖ De acuerdo a los bioensayos de patogenicidad contra *E. varivestis*, *A. aegypti* y *A. mellifera*, *P. deleyi* ET-90 tiene especificidad hacía *M. sacchari*
- ❖ Las cepas de *Bacillus* ET-15 y ET-30 producen proteasas y fosfolipasas, factores de virulencia asociados a la patogenicidad, dichas enzimas no son producidas por *P. deleyi* ET-90.

Perspectivas

- ❖ Determinar la CL_{50} mediante unidades formadoras de colonia (UFC) de las cepas ET-30 y ET-15
- ❖ Llevar a cabo un análisis genómico comparativo de las cepas ET-90 y ET-30 con bacterias del género *Pantoea* y *Bacillus*, respectivamente.

Bibliografía

- Aktories K., Schwan C., Papatheodorou P. 2012. Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. *Toxicon*, 60: 572-581.
- Ali M., Luttrell R. 2009. Response estimates for assessing Heliothine susceptibility to Bt toxins. *Journal of Economic Entomology*, 102 (5): 1935-1947.
- Alquisira-Ramírez E.V., Paredes-Gonzalez J.R., Hernández-Velázquez V.M., Ramírez-Trujillo J.A., Peña-Chora G. 2014. *In vitro* susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie*, 45(6): 707-718.
- Alquisira-Ramírez E.V., Paredes-Gonzalez J.R., Hernández-Velázquez V.M., Ramírez-Trujillo J.A., Peña-Chora G. 2014. *In vitro* susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie*, 45(6): 707-718.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410.
- Armstrong J.S., Mbulwe L., Sekula-Ortiz D., Villanueva R.T., Rooney W.L. 2017. Resistance to *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae) in forage and grain sorghums. *Journal of economic entomology*, 110(1): 259-265.
- Arthurs S. Dara S.K. 2018. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of invertebrate pathology*. Article in press.
- Berlanga-Padilla A.M., Ayala-Zermeño M.A., Gallou A., Serna-Domínguez M.G., Montesinos-Matías R., Arredondo-Bernal H.C. 2016. Identificación de *Lecanicillium*

- longisporum* asociado a *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae), en sorgo. Revista Mexicana de Micología, 44: 51-54.
- Blackburn M.B., Farrar R.R., Novak N.G. 2006. Remarkable susceptibility to the diamondback moth (*Plutella xylostella*) to ingestion of Pir toxins from *Photorhabdus luminescens*. Entomologia. Experimentalis et Applicata, 121: 31-37.
- Blackman R.L., Eastop V.F., 1984. Aphids on the world's crops: An identification and information guide. Wiley, New York. 476 p.
- Bowling R, Brewer M, Kerns D, Gordy J, Seiter N, Elliott N. et al., 2016. Sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae): A new pest on sorghum in North America. Journal of Integrated Pest Management, 7(1): 12; 1-13.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Brady C., Cleenwerck I., Venter S., Vancanneyt M., Swings J., Coutinho T. 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). Systematic and Applied Microbiology, 31(6): 447-460.
- Bravo A., Gómez I., Conde J., Muñoz-Garay C., Sánchez J., Miranda R., Zhuang M., Gill S.S., Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1667(1): 38-46.

- Chougule N., Bonning B. 2012. Toxins for transgenic resistance to Hemipteran pests. *Toxins*, 4 (12): 405-429.
- Chow J., Lee S.M., Shen Y., Khosravi A., Mazmanian S.K. 2010. Host–Bacterial symbiosis in health and disease. *Advances in Immunology*, 107: 243–274.
- Cortez-Mondaca E., López-Buitimea M., López-Arroyo J.I., Orduño-Cota F.J., Herrera-Rodríguez G. 2016. Especies de Chrysopidae asociadas al pulgón del sorgo en el norte de Sinaloa, México. *Southwestern Entomologist*, 41(2): 541-545.
- Coto D., Saunders J.L. 2004. Insectos plagas de los cultivos perennes con énfasis en frutales en América Central. Turrialba. Serie Técnica. Manual técnico/CATIE; No. 52. 420p.
- de Maagd R., Bravo A., Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17: 193–199.
- de Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N. Schnepf H. E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Reviews of Genetics*, 37: 409- 433.
- Delétoile A., Decré D., Courant S., Passet V., Audo J., Grimont P., Arlet G., Brisse S. 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2): 300-310.
- DGIAAP-SENASICA. 2013. Lista de Plaguicidas de uso agrícola autorizados. <http://www.senasica.gob.mx/?id=4099>.

- Dodd S.J., Hurst M.R., Glare T.R. 2006. Occurrence of sep insecticidal toxin complex genes in *Serratia spp.* and *Yersinia frederiksenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 6584-6592.
- Evans J.D., Chen Y.P., Prisco G.D., Pettis J., Williams V. 2009. Bee cups: single-use cages for honey bee experiments. *Journal of Apicultural Research*, 48(4): 300-302.
- Fang S., Wang L., Guo W., Zhang X., Peng D., Luo C., Yu Z., Sun M. 2009. *Bacillus thuringiensis* Bel protein enhances the toxicity of Cry1Ac protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 5237–5243.
- Fedhila S., Nel P., Lereclus D. 2002. The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *Journal of bacteriology*, 184(12): 3296-3304.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Field L.M., Devonshire A.L. Forde B.G. 1988. Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochemical Journal*, 251: 309–312.
- Fuchs T.M., Bresolin, G., Marcinowski L. 2008. Insecticidal genes of *Yersinia spp.*: Taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. *BMC Microbiology*, 2008: 8: 1-11.

- Funasaki G., Po-Yung Lai, Nakahara L. M., Beardsley J.W., Ota A.K. 1988. A review of biological control introductions in Hawaii: 1890 to 1985. Proceedings, Hawaiian Entomological Society, 28: 105-160.
- Gómez I., Arenas I., Benitez I., Miranda-Ríos J., Becerril B., Grande A.R., Almagro J.C., Bravo A., Soberón M. 2006. Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. Journal of Biological Chemistry, 281(45): 34032-34039.
- Gómez I., Sánchez J., Miranda R., Bravo A., Soberón M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Letters, 513(2-3): 242-246.
- Hall D.G. 1987. The sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner), in Florida. American Society Sugar Cane Technologists, 7: 26-29.
- Han J.H., Jin B.R., Kim J.J., Lee S.Y. 2014. Virulence of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* for the microbial control of *Spodoptera exigua*. Mycobiology, 42: 385–390.
- Harrison R.L., Bonning B.C. 2010. Proteases as insecticidal agents. Toxins, 2(5): 935-953.
- Hashimoto Y. 2002. Study of the bacteria pathogenic for aphids, isolation of bacteria and identification of insecticidal compound. Report of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Station (Japan).

- Heimpel A.M. 1955. Investigations of the mode of action of strains of *Bacillus cereus* Frankland and Frankland pathogenic for the larch sawfly, *Pristiphora erichsonii*. Canadian Journal of Zoology, 31: 1-26.
- Heimpel A.M. 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. Annual review of entomology, 12(1): 287-322.
- Hunter W.B., Hsu H.T. 1999. Synthetic diets and piercing-sucking insect research. International Journal of Ecology and Environmental Science, 25: 259–266.
- Hurst M.R., Beard S.S., Jackson T.A. 2007. Isolation and characterization of the *Serratia entomophila* antifeeding prophage. FEMS Microbiology Letters, 270: 42-48.
- Hurst M.R., Glare T.R., Jackson T.A., Ronson C.W. 2000. Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photobacterium luminescens*. Journal of Bacteriology, 182: 5127-5138.
- Hurst M.R., Jones S.A., Binglin T. 2011. The main virulence determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 is a broad-host-range toxin complex active against insects. Journal of Bacteriology, 193: 1966-1980.
- Jackson T.A., Huger A.M., Glare T.R. 1993. Pathology of amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Invertebrate Pathology, 61(2): 123-130.
- Jukes T.H., Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York. 21-132 pp,

- Julian G.S., Bulla L.A., Sharpe E.S., Adams G.L. 1973. Bacteria, spirochetes, and rickettsia as insecticides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 217(1): 65-75.
- Just I., Gerhard R. 2005. Large clostridial cytotoxins. *Review of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 152: 23-47.
- Katrunkha G.S., Zarubina A.P., Iudina T.P. 2009. Antibiotics produced by *Photorhabdus luminescens* ZMI, a symbiont of entomopathogenic nematodes. *Antibiot Khimioter*, 54: 11-16.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-1874.
- Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 1-41.
- Lee E.H., Eo J.K., Ka K.H., Eom A.H. 2013. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. *Mycobiology*, 41(3): 121-125.
- Lopez I., Ruiz-Larrea F., Cocolin L., Orr E., Trevor P., Megan M., VanderGheynst J., Mills D.A. 2003. Design and evaluation of PCR primer's for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6801-6807.
- Malleswari D., Bagyanarayana G. 2013. *In vitro* screening of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of medicinal and aromatic plants for multiple plant growth promoting activities. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3: 84-91.

- Marina M.A.S., García V.H., Velasco C.R., Chávez N.L., Castillo J.A.M., Hernández M.H.C. 2017. *Melanaphis sacchari*, a new pest of *Sorghum halepense* at Chiapas, México, and its predators. *Southwestern Entomologist*, 42(2): 401-404.
- Martínez-Valenzuela C., Gómez-Arroyo S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(4): 185-200.
- Mead F.W. 1978. Sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) Florida New Continental United States Record. *Cooperative Plant Pest Report*, 3(34): 475.
- Monnerat R.G., Bravo A. 2000. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: Modo de acao e resistencia, in *Controle Biológico*, I. S. Melo and J. L. Azevedo, Eds., pp. 163–200, Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, Brazil.
- Nicolas L., Charles J.F., Debarjac H. 1993. *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia*; characterization of putative mosquito larvicidal proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 113: 23-29.
- Nishiwaki H., Nakashima K., Ishida C. 2007. Cloning, functional characterization and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, Sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3404-3411.
- Obeidat M., Khyami-Horani H., Al-Momani F. 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxins and δ -endotoxins to *Drosophila melanogaster*, *Ephestia kuhniella* and human erythrocytes. *African Journal of Biotechnology*, 11(46): 10504-10512.
- Pacheco S., Gómez I., Arenas I., Saab-Rincon G., Rodríguez-Almazán C., Gill S.S. Soberón M. 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is

- involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidasa - N and cadherin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(47): 32750-32757.
- Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., de Escudero I.R., Caballero P. 2014. Molecular and insecticidal characterization of a novel Cry-related protein from *Bacillus thuringiensis* toxic against *Myzus persicae*. *Toxins*, 6(11): 3144-3156.
- Park Y., Abdullah M., Taylor M., Rahman K., Adang M. 2009. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to Coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (10): 3086-3092.
- Péchy-Tarr M., Bruck D.J., Maurhofer M. 2008. Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Microbiology*, 10: 2368-2386.
- Peña-Chora G., Miranda-Rios J., de la Riva G., Pardo-López L., Soberón M., Bravo A. 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1): 353-360.
- Porcar M., Grenier A., Federici B., Rahbe Y. 2009. Effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (14): 4897-4900.
- Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18: 189 –194.

- Rodríguez del Bosque L.A., Rodríguez-Vélez B., Sarmiento-Cordero M A., Arredondo-Bernal H.C. 2018. Natural enemies of *Melanaphis sacchari* on grain sorghum in northeastern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 43(1): 277-279.
- Rodríguez del Bosque L.A., Terán A.T. 2015. *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae): A new sorghum insect pest in Mexico. *Southwestern Entomologist*, 40 (2): 433-434.
- Ruffner B., Péchy-Tarr M., Ryffel F. 2013. Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. *Environmental Microbiology*, 3: 751-763.
- Ruiu L. 2015. Insect pathogenic bacteria in Integrated Pest Management. *Insects*, 6: 352-367.
- Sabtharishi S., Naveen N.C. 2017. Bioassay for monitoring insecticide toxicity in *Bemisia tabaci* populations. Protocol Exchange. Nature Publishing Group.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425.
- Salas M.A., Hernández V., Ríos C., Lule N., Mauricio J.A., Chávez M.H. 2017. *Melanaphis sacchari*, a new pest of *Sorghum halepense* at Chiapas, México, and its predators. *Southwestern Entomologist*, 42: 401–404.
- Sarwar M. 2015. The killer chemicals as controller of agriculture insect pests: The conventional insecticides. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 1(3): 141-147.

- Sattar S., Maiti M. 2011. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against Sap-Sucking insect pest. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (9): 937-946.
- Schnepf E., Crickmore N.V., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D., Dean D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 775-806.
- SENASICA. 2014. Pulgón amarillo *Melanaphis sacchari* (Zehntner). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica, No 43, 15 p.
- Sicard M., Le Brun N., Pages S. 2003. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: Contrasting types of interaction. *Parasitology Research*, 91: 520-524.
- Singh B.U., Padmaia P.G., Seetharama N. 2004. Biology and management of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae), in sorghum: a review. *Crop Protection*, 23: 739-755.
- Singh P., Park D., Forst S. 2013. Xenocin export by the flagellar type III pathway in *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Bacteriology*, 195: 1400-1410.
- Spanier B., Starke M., Higel F. 2010. *Yersinia enterocolitica* infection and tcaA-dependent killing of *Ceaeenorhabditis elegans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6277-6285.

- Stavrínides J., No A., Ochman H. 2010. A single genetic locus in the phytopathogen *Pantoea stewartii* enables gut colonization and pathogenicity in an insect host. *Environmental Microbiology*, 12(1): 147-155.
- Tambong J.T., Xu R., Kaneza C.A., Nshogozabahizi, J.C. 2014. An In-depth analysis of a multilocus phylogeny identifies *leuS* as a reliable phylogenetic marker for the genus *Pantoea*. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 10: 115-125.
- Tennant S.M., Skinner N.A., Joe A. 2005. Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and their contribution to virulence. *Infection and Immunity*, 73: 6860-6867.
- Tjamos E.C., Tjamos S.E., Antoniou P.P. 2010. Biological management of plant diseases: highlights on research and application. *Journal of Plant Pathology*, 92 (4): 17-21.
- Toledo-Hernández E., Hernández-Velázquez V.M., Peña-Chora G. 2018. An artificial diet for the sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari* Zehntner) (Hemiptera: Aphididae) with potential uses for *in vitro* toxicological studies. *Florida Entomologist*, Article in press.
- Torres-Quintero M.C., Arenas-Sosa I, Hernández-Velázquez V.M., Suárez-Rodríguez R., Peña-Chora G. 2016. Characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) strains pathogenic to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) *Florida Entomologist*, 99(4): 639-643.
- Torres-Quintero M.C., Arenas-Sosa I, Peña-Chora G., Hernández-Velázquez V.M. 2013. Feeding chamber for *Myzus persicae* culture (Hemiptera: Aphididae). *Florida Entomologist*, 96: 1600–1602.

- Toumanoff, C. 1953. Description de quelques souches entomophytes de *Bacillus cereus* Frank. and Frank. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf. Annales De l'Institut Pasteur, 85: 90-99.
- Tweten R.K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. Infection and Immunity, 73: 6199-6209.
- Větrovský T., Baldrian P. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. PloS one, 8(2): e57923.
- Vodovar N., Vallenet D., Cruveiller S. 2006. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. Nature Biotechnology, 24: 673-679.
- Walterson A.M., Stavrinides J. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. FEMS Microbiology Reviews, 39(6): 968-984.
- Waterfield N., Hares M., Yang G. 2005. Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. Cellular Microbiology, 7: 373-382.
- Waterfield N., Kamita S.G., Hammock B.D. 2005. The *Photorhabdus* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. FEMS Microbiology Letters, 245: 47-52.
- White W.H., Reagan T.E., Hall D.G. 2001. *Melanaphis sacchari* (Homoptera: Aphididae), A sugarcane pest new to Louisiana. Scientific Notes, 84 (3): 435-436.
- Wilson A.C.C., Duncan R.P. 2015. Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbioses. PNAS, 112 (33): 10255-10261.

- Yamamoto S., Harayama S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 1104-1109.
- Yu X., Liu T., Liang X., Tang C., Zhu J., Wang S., Li S., Deng Q., Wang L., Zheng A., Li P. 2011. Rapid detection of *vip1*-type genes from *Bacillus cereus* and characterization of a novel *vip* binary toxin gene. *FEMS Microbiology Letters*, 325 (1): 30-36.
- Zapata S.D., Dudensing R., Sekula D., Esparza-Díaz G., Villanueva R. 2018. Economic impact of the sugarcane aphid outbreak in South Texas. *Journal of Agricultural and Applied Economics*, 50(1): 104-128.
- Zhang X., Candas M., Griko N.B., Rose-Young L., Bulla L.A. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*, 12(11): 1407.
- Zhang X., Candas M., Griko N.B., Taussig R., Bulla L.A. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26): 9897-9902.

Páginas de internet consultadas

www.inifap.com

www.itis.gov

www.senasica.com

www.siap.com

Anexos

1.1.- Medio LB

10g/L de peptona de caseína

5g/L de extracto de levadura

10g/L de NaCl

16g/L de agar

pH7.2

1.2.- Medio con sacarosa al 30% con agua de garrafón.

300 g/L de sacarosa

7.3 mL/L de cloruro de colina al 15%

4.4 mL/L de formalina al 10%

Aforar a un litro con agua de garrafón y esterilizar por 20 min.

1.3.- Medio HCT

Ajustar pH 7.25. Después de esterilizar el medio y las soluciones por separado, se adicionan las soluciones para preparar el medio en campana de flujo laminar. Por litro de medio poner Soluciones I= 50 mL, II= 1 mL, III=10 mL, IV=10 mL y 30 mL de glucosa al 10% y 17 g/L.

Bacto Triptona 5 g/L

Casa-áminoácidos 2 g/L

Solución I KH_2PO_4 68 g/L

Solución II $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.3 g/L

MnSO₄ H₂O 0.169 g/L

ZnSO₄ 7H₂O 1.4 g/L

Solución III FeSO₄ 7H₂O 2 g/L

H₂OSO₄ 100 mL/l (1N)

Solución IV CaCl₂ 2H₂O 14.7 g/L

1.4.- El volumen total de reacción fue de 25 µL utilizando el master mix siguiente: 2.5 µL solución amortiguadora (10X), 1 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL dNTP (10 mM), 1 µL de los iniciadores a 10 pmol µL⁻¹, 1 µL Taqpol 3U/reacción, 17 µL H₂O mili-Q, 2 µL ADN (100ng). Finalizados los ciclos de la PCR, los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1 % con de bromuro de etidio ó SYBR Green. Así también, se utilizó el marcador de peso molecular de 1.5 kb (GeneRuler) para calcular el tamaño de los amplicones.

1.5.- Dieta de abejas (100 mL)

Agua de garrafón 100 mL

Sacarosa 50 g

Aforar a 100 mL con agua de garrafón y esterilizar por 20 min.

1.6.-Buffer de carbonatos 100 mL

Solución A: NaCO₃ 5.5 g

Solución B: NaHCO₃ 4.2 g

Agregar 20 mL de la solución B en 80 mL de la solución A y ajustar a pH 10.5

1.7.-Medio YEP

10 g/L de peptona de caseína

5 g/L de extracto de levadura

5 g/L de NaCl

pH 7.2