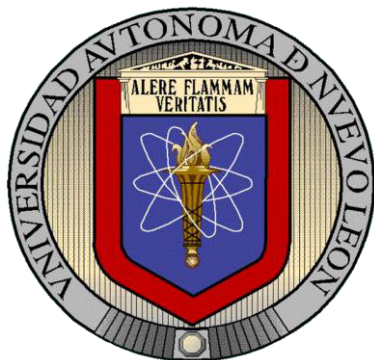


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



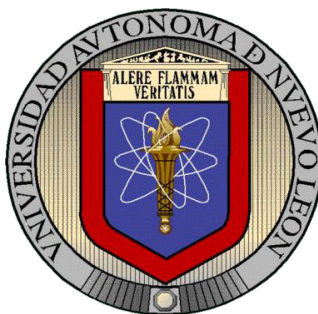
**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE CEPAS NATIVAS Y DE
COLECCIÓN DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA EL NEMATODO
FORMADOR DE NÓDULOS DE LA RAÍZ (*Meloidogyne incognita*)**

Por

QBP JUAN JARAMILLO PINEDA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA**

Septiembre 2014



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE CEPAS NATIVAS Y DE
COLECCIÓN DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA EL NEMATODO
FORMADOR DE NÓDULOS DE LA RAÍZ (*Meloidogyne incognita*)**

Comité de Tesis

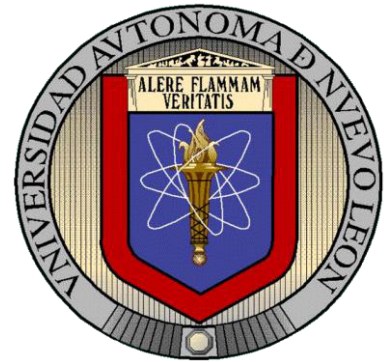
Dra. Lilia H. Morales Ramos
Presidente

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Secretario

Dra. Isela Quintero Zapata
Vocal

Dr. Carlos Sandoval Coronado
Vocal

Dra. Myriam Elías Santos
Vocal



Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Lilia H. Morales Ramos, en el Laboratorio 1 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a mis padres Juan Jaramillo y Julia Pineda, quienes me dieron la educación y me inculcaron valores, les debo lo que soy. Gracias por su confianza, sacrificios y amor.

A mi esposa Miriam A. Martínez sin tu apoyo y tu amor no hubiera logrado esto, gracias por estar siempre conmigo.

A mis hermanos Adiel Jaramillo y Lyliana Jaramillo que son un ejemplo a seguir, compañeros en las buenas y en las malas con los que siempre puedo contar.

A mis amigos, por lo que hemos compartido, su apoyo moral y que de alguna u otra manera me ayudaron a realizar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lilia H. Morales siempre le voy a estar agradecido por permitirme formar parte de su equipo de trabajo desde que empecé en un verano científico. Gracias por toda la ayuda desinteresada, los consejos y la paciencia a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Lucía Palacios, gracias por todo el apoyo y todos sus conocimientos.

Al MC. Nabor González, gracias por ayudarme con la base de este proyecto, excelente persona.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Katiushka Arévalo, Dra. Isela Quintero, Dra. Myriam Elías, Dr. Carlos Sandoval por el tiempo que emplearon para la revisión de esta tesis.

A todos los alumnos que me ayudaron mientras hacían servicio social y verano científico: Alejandra Cardoso, Alejandra Leíja, Diana, Aldo, Rocío y Marcela.

Soy de los alumnos que tienen que agradecer a casi todo el Instituto de Biotecnología ya que en varios laboratorios me ayudaron y me brindaron su amistad.

A todos los integrantes del L1, especialmente a Isabel, Hilda, David y Mayra gracias por sus consejos y los buenos momentos.

En el L3 a Adriana y Ana Laura, gracias por siempre tener tiempo para ayudarme, sus consejos y su valiosa amistad.

En el L4 al Dr. Benito Pereyra, a la Dra. Astrid Espino y a la MC. Claudia López de quienes aprendí mucho y me adoptaron como compañero temporal.

En el L5 al Dr. José María Viader y la Dra. Martha Guerrero, excelentes maestros y personas, gracias por su apoyo y consejos. A Mauricio, Miguel y Alberto grandes amigos que siempre estoy molestando con mis dudas de Biología Molecular.

Al CONACyT por la beca y el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

I ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
DEFINICIÓN DE PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	4
HIPÓTESIS.....	6
OBJETIVOS.....	7
ANTECEDENTES.....	9
<i>Bacillus thuringiensis</i>	10
Morfología.....	11
<i>Bacillus thuringiensis</i> contra nematodos.....	12
<i>Meloidogyne incognita</i>	15
Distribución.....	18
Morfología.....	18
Ciclo de vida.....	19
Identificación de especies.....	21
MATERIAL MÉTODO.....	23
Cultivo de <i>Meloidogyne</i>	23
Identificación molecular de la especie de <i>Meloidogyne</i>	24
Material biológico.....	24
Selección de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
Activación de cepas.....	27
Preparación de cultivos.....	27
Determinación de la actividad nematocida de cultivos completos de <i>Bacillus thuringiensis</i> in vitro.....	28

Obtención de proteínas de cultivos de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
Obtención de proteínas sobrenadantes de cultivos de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
Determinación de la actividad nematocida del complejo espora-cristal in vitro.....	30
Determinación de la actividad nematocida de las proteínas extracelulares in vitro.....	30
Evaluación de las cepas que presentaron mejores resultados a nivel Invernadero utilizando plantas de belén (<i>Impatiens sultanii</i>) infestadas con <i>Meloidogyne incognita</i>	31
Caracterización de las proteínas extracelulares de sobrenadantes que presentaron mayor actividad tóxica contra <i>Meloidogyne incognita</i>	32
Identificación de genes <i>cry</i> presentes en las cepas con mayor actividad tóxica contra <i>Meloidogyne incognita</i>	33
ESTRATEGIA GENERAL.....	35
RESULTADOS.....	37
Cultivo de <i>Meloidogyne</i>	37
Identificación molecular de la especie de <i>Meloidogyne</i>	40
Selección de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
Determinación de la actividad nematocida de cultivos completos de <i>Bacillus thuringiensis</i> in vitro.....	47
Determinación de la actividad nematocida del complejo espora-cristal in vitro.....	49
Determinación de la actividad nematocida de las proteínas extracelulares in vitro.....	51
Evaluación de las cepas que presentaron mejores resultados a nivel Invernadero utilizando plantas de belén (<i>Impatiens sultanii</i>) infestadas con <i>Meloidogyne incognita</i>	52

Caracterización de las proteínas extracelulares de sobrenadantes que que presentaron mayor actividad tóxica contra <i>Meloidogyne incognita</i>	54
Identificación de genes <i>cry</i> presentes en las cepas con mayor actividad tóxica contra <i>Meloidogyne incognita</i>	57
DISCUSION.....	59
CONCLUSIONES.....	65
REFERENCIAS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Síntomas y cultivos susceptibles a los principales nematodos fitoparásitos....	16
Tabla 2. Características de los iniciadores específicos para los genes <i>cry5</i> , <i>cry6</i> <i>cry12</i> , <i>cry13</i> , <i>cry14</i> , <i>cry21</i> y <i>Bt16S</i>	35
Tabla 3. Efecto de <i>Meloidogyne incognita</i> en plantas de belén, pepino y tomate bajo condiciones de invernadero.....	39
Tabla 4. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> pertenecientes a la colección del Instituto de Biotecnología UANL FCB activadas.....	46
Tabla 5. Efecto nematicida de cultivos completos de <i>Bacillus thuringiensis</i> en <i>Meloidogyne incognita</i>	48
Tabla 6. Porcentaje de mortalidad de diferentes concentraciones proteínas cristal purificadas de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra <i>Meloidogyne incognita</i>	50
Tabla 7. Efecto nematicida del sobrenadante de cultivos de <i>Bacillus thuringiensis</i> en <i>Meloidogyne incognita</i>	51
Tabla 8. Efecto de las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 en plantas de belén infectadas artificialmente con <i>Meloidogyne incognita</i>	53
Tabla 9. Actividad proteolítica de 4 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp.....	20
Figura 2. Plántulas de pepino, tomate y belén en condiciones de invernadero.....	38
Figura 3. Extracción de nematodos juveniles utilizando la técnica del embudo de Bearman y extracción manual de huevecillos de raíces infectadas.....	38
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa ADN genómico de nematodos juveniles con el método de TSNT.....	40
Figura 5. Producto de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de nematodos juveniles.....	41
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE1X de la integridad del ADN plasmídico aislado de clonas transformadas con el producto de la ligación del vector pGEM y el fragmento ITS.....	42
Figura 7. Productos de amplificación por PCR a partir de varios plásmidos de diferentes colonias de <i>E. coli</i> transformadas.....	43
Figura 8. Alineamiento entre las secuencias nucleotídicas directas o complementarias reversas obtenidas por secuenciación del plásmido con el fragmento ITS integrado. Además muestra la secuencia consenso de este alineamiento.....	44

Figura 9. Análisis BLASTn de la secuencia consenso de un fragmento de ADNr de nematodos juveniles amplificada por PCR.....	45
Figura 10. Halo de hidrólisis de actividad proteolítica de <i>Bt</i> en Agar métodos estándar suplementado con 1% de leche descremada.....	54
Figura 11. SDS-PAGE de proteínas del sobrenadante de las cepas seleccionadas de <i>Bt</i>	55
Figura 12. SDS-PAGE de proteínas cristal de las cepas seleccionadas de <i>Bt</i>	57
Figura 13. Productos de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de 4 cepas.....	58

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNr	ADN ribosomal
BLAST	Herramienta básica de búsqueda y alineaciones locales
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
<i>et al.</i>	Et alii (y otros)
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
h	Horas
ITS	Secuencias de regiones espaciadoras transcritas internas
J ₂	Juveniles de segunda etapa
kb	Kilobase = Mil pares de bases
kDa	Kilodaltones
M	Marcador de peso molecular o concentración expresada en molar
mm	Milímetro
ml	Mililitro
min	Minuto
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OGD	Orificio de la glándula dorsal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
spp	Especies
subsp	Subespecie
TE	Amortiguador de pH Tris-EDTA
Tris	Trizma o tris (hidroximetil) aminometano
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-Cl
U	Unidades
USD	United states dollar
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µm	Micra
µg	Microgramo
µg/mL	Microgramos por mililitro
µl	Microlitro
µM	Micromolar

RESUMEN

Meloidogyne incognita es uno de los nematodos que infesta las raíces de los cultivos de importancia, resultando en pérdidas anuales de cultivos valoradas en 50 billones USD anuales alrededor del mundo. En México, la SAGARPA ha reportado la presencia del nematodo *Meloidogyne incognita* donde su control se lleva a cabo en gran medida por el uso de nematicidas químicos. Debido a la creciente preocupación ambiental, la búsqueda de alternativas se ha enfocado en el control biológico. *Bacillus thuringiensis* es un bacilo Gram positivo, esporulado, representa el mayor volumen de los bioinsecticidas a nivel mundial, produce una o más inclusiones de cristal paraesporal (Cry o δ -endotoxinas). A la fecha se le ha reportado actividad tóxica para larvas de nematodos de vida libre o parásitos a seis proteínas Cry. Diferentes estudios con los sobrenadantes de los cultivos de *Bacillus* indican que enzimas catabólicas, péptidos antibióticos o pequeñas moléculas secretadas pueden contribuir a la actividad contra nematodos. Para estudiar el potencial uso de las proteínas extracelulares y las proteínas cristal para el control de nematodos fitoparásitos estudiamos el efecto nematicida contra el nematodo formador de nódulos de la raíz. Las poblaciones de nematodos utilizadas para los bioensayos fueron cultivadas en plantas belén (*Impatiens sultanii*) en condiciones de invernadero. Para la identificación de especie de los nematodos se amplificó una región génica del ADNr que contiene dos regiones ITS. Para su posterior secuenciación, dicha región se ligó al vector pGEM®-T. El análisis con el programa BLASTn indicó que la región génica presentó una identidad del 99.8% respecto a una secuencia génica perteneciente a *Meloidogyne incognita*. Las cepas de *Bt* utilizadas provenían del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, utilizamos 23 cepas para los bioensayos con cultivos completos en placas de 24 pozos donde 14 (60.86%) de 23 cepas mostraron una mortalidad superior al 60%, para los siguientes bioensayos se descartaron 9 cepas. El efecto nematicida de las proteínas cristal de 14 cepas fue estudiado in vitro contra *Meloidogyne incognita* las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 demostraron la más alta actividad nematicida (66, 76, 68 y 70%). Además los sobrenadantes fueron de las 14 cepas fueron examinados in vitro donde se observaron mortalidades de 30% o superior después de 24 h de incubación en las cepas Las cepas HD-1, GM-2, GM-34, HD-59, GM-70 y HD-183. El cultivo completo, sobrenadante y complejo espora cristal de 4 cepas (con mejor actividad in vitro) fueron evaluadas para determinar su actividad contra *Meloidogyne incognita* en plantas de belén donde el cultivo completo de GM-2 logró un 58% de reducción en el número de nódulos y un 70% en la reducción de número de masas de huevecillos. De las 4 cepas solo la GM-2 contenía 2 genes *cry* contra nematodos, resultando positiva para *cry12* y *cry14* mostrando los productos de PCR esperados. Este estudio aporta resultados para considerar a la cepa GM-2 como un posible agente de control biológico contra nematodos *Meloidogyne incognita*, sin embargo se requiere investigación adicional para identificar los principios activos en su toxicidad, esto ayudara a incrementar su potencial como agente de control biológico para nematodos.

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la agricultura las civilizaciones sufrieron frecuentemente la devastación de sus cosechas por los ataques de las plagas de insectos. Al principio se intentaba controlar con enemigos naturales, sin embargo esto perdió importancia entre 1930 y 1940 al descubrirse los insecticidas químicos, que originalmente fueron concebidos como armas químicas, ya que resultaron ser mucho más rápidos, baratos y con un espectro de acción más amplio que los enemigos naturales de los insectos, su uso se extendió rápidamente hasta llegar a constituirse en una herramienta imprescindible de la agricultura moderna (Torres, 2002).

Si bien los insecticidas químicos han permitido un control eficaz de las plagas, se ha establecido que estos compuestos son altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas (Torres, 2002); además, por su persistencia en el medio ambiente, favorecen la selección de insectos plaga resistentes a ellos, lo que ha motivado el uso de dosis cada vez mayores o de productos cada vez más tóxicos (Galán, 1993).

Recientemente la humanidad preocupada por solucionar los problemas de contaminación ambiental ocasionado por el uso indiscriminado de insecticidas químicos para el combate de plagas, ha implementado el manejo integral de plagas, del cual forma parte importante el control biológico (De Luna, 2002), se define como la represión de las plagas mediante sus enemigos naturales; como predadores, parásitos y patógenos (Cisneros, 1995).

Las formulaciones comerciales de los microorganismos son conocidas como bioinsecticidas e incluyen a diferentes géneros y especies de bacterias, hongos, nematodos y virus. Estos microorganismos, denominados entomopatógenos, son

específicos: afectan sólo a determinados grupos de insectos (hospederos) y son inofensivos para insectos benéficos, humanos y otros organismos superiores.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) representa el mayor volumen de los bioinsecticidas producidos en el ámbito mundial (Tamez *et al.*, 2004), las cepas de *Bt* pueden producir compuestos de varias estructuras químicas y propiedades (Mohammed *et al.*, 2008). *Bt* produce una o más inclusiones de cristal paraesporal (Cry o δ -endotoxinas) estas proteínas son conocidas por ser tóxicas a un amplio rango de especies de insectos (Feitelson *et al.*, 1992). Algunas proteínas Cry son también tóxicas para nematodos (Leynset *et al.*, 1995). A la fecha se le ha reportado actividad tóxica para larvas de nematodos de vida libre o parásitos a seis proteínas Cry (Cry5B, Cry6A, Cry12, Cry13, Cry14A, Cry21A) (Wei *et al.*, 2003; Mohammed *et al.*, 2008; Gholamreza *et al.*, 2008). Diferentes estudios con los sobrenadantes de los cultivos de *Bacillus* indican que enzimas catabólicas (proteasas, quitinasas y glucanasas), péptidos antibióticos o pequeñas moléculas secretadas por las especies de *Bacillus* pueden contribuir a la actividad contra nematodos patogénicos (Márquez and Fernández 2006; Lian *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2008).

Entre las plagas que afectan el sector agrícola, los nematodos fitoparásitos son responsables de pérdidas económicas considerables, (Boina *et al.*, 2008). En México los insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* son en su mayoría de importación y, el uso de estos productos está difundido y se aplican en diversos tipos de cultivos, sin embargo su consumo no es constante ni se dispone de las mejores técnicas para aplicarlos (Quintero, 1997). Para promover el crecimiento de este mercado es necesario obtener nuevas cepas nematicidas, para llegar a un producto comercial y proponer la sustitución de plaguicidas químicos tóxicos (tal es el caso de los nematicidas), por productos biológicos no contaminantes.

DEFINICIÓN DE PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los nematodos son los animales multicelulares más abundantes en la faz de la tierra, varios cientos de especies de nematodos son conocidos por alimentarse de plantas vivas y causar una variedad de enfermedades en todo el mundo (Mohammed *et al.*, 2008). Los nematodos parásitos de plantas son un grupo de organismos microscópicos que viven en el suelo y atacan las raíces o partes aéreas de muchos cultivos. Con frecuencia causan daños tan serios, que es imposible mantener una agricultura económicamente viable, sin el uso de alguna forma de control nematológico (Zuckerman *et al.*, 1990).

Los nematodos formadores de nódulos de la raíz (*Meloidogyne* spp.) se encuentran en todo el mundo, pero con mayor frecuencia y abundancia en regiones con clima cálido e inviernos cortos y moderados. Estos nematodos se encuentran también en los invernaderos donde se usan suelos no esterilizados. Atacan a más de 2000 especies de plantas, incluyendo a la mayoría de las plantas cultivadas (Agrios, 2008). *Meloidogyne* spp. es el nematodo que infesta las raíces más importante, y causa pérdidas anuales de cultivos valoradas en 50 billones USD anuales alrededor del mundo (Boina *et al.*, 2008).

En primer lugar es necesaria la prevención de la entrada del nematodo, pues una vez que éste se ha establecido es prácticamente imposible erradicarlo, por lo que es importante el uso de semillas y plántulas certificadas y material limpio de nematodos (Agrios, 2008). Si los niveles detectados están por encima del umbral económico de daño se recomienda el uso de un nematicida, métodos de control alternativo como la solarización y biofumigación del suelo o una combinación de ellos (Zuckerman *et al.*,

1990). El Bromuro de metilo, fumigante de suelo usado para controlar el nematodo formador de nódulos y otros patógenos del suelo, fue prohibido en EUA para la fumigación de suelo debido a sus fuertes propiedades que debilitan la capa de ozono (Boina *et al.*, 2008).

En este trabajo se buscó entre las cepas nativas de *B. thuringiensis*, pertenecientes a la colección de entomopatógenos del Instituto de Biotecnología FCB, UANL, aquellas con alta actividad nematicida contra *Meloidogyne incognita*, explorando el efecto nematicida del complejo espora cristal (endotoxinas) y/o productos extracelulares (exotoxinas) con el fin de obtener nuevas cepas nematicidas, que encaminen al desarrollo de un producto comercial y proponer la sustitución de plaguicidas químicos tóxicos, que como el bromuro de metilo han sido prohibidos como esterilizantes del suelo por el impacto que causan al ambiente.

HIPÓTESIS

La extensa variedad de las cepas de *Bt* y las toxinas que producen permiten la producción de bioinsecticidas, en la colección de cepas de *Bt* del Instituto de Biotecnología es posible encontrar al menos una cepa con actividad toxica para nematodos del genero *Meloidogyne* spp. que contenga alguno de los genes *cry* reportados con actividad tóxica para nematodos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* que muestren actividad contra el nematodo de las agallas *Meloidogyne* determinando el efecto nematocida del complejo espora cristal (endotoxinas) y/o productos extracelulares

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Implementar un cultivo de *Meloidogyne*.
2. Identificación molecular de la especie del género *Meloidogyne*.
3. Seleccionar cepas de *Bacillus thuringiensis* en base a reportes de literatura con actividad nematocida y cultivarlas.
4. Determinar actividad nematocida de cultivos completos de *Bacillus thuringiensis* in vitro.
5. Obtener el complejo espora-cristal de cultivos de las cepas de *Bacillus thuringiensis*.
6. Obtener las proteínas sobrenadantes de cultivos de las cepas de *Bacillus thuringiensis*.
7. Determinar la actividad nematocida del complejo espora-cristal in vitro.

8. Determinar la actividad nematocida de las proteínas extracelulares in vitro.
9. Evaluar las cepas que presenten mejores resultados a nivel invernadero utilizando plantas de Belén (*Impatiens sultanii*) infestadas con *Meloidogyne incognita*.
10. Caracterizar las proteínas extracelulares de sobrenadantes que presenten mayor actividad toxica contra *Meloidogyne incognita*.
11. Identificar los genes *cry* presentes en las cepas con actividad toxica contra *Meloidogyne incognita*.

ANTECEDENTES

Existen miles de organismos, como microbios, insectos y ácaros, así como malezas, que compiten con el hombre por comida, fibras, asilo (King, 1996). Ante esta situación, el hombre fue desarrollando algunas estrategias para su control y es así que desde hace algunos siglos los chinos utilizaron hormigas para proteger sus huertas de cítricos contra gusanos, avispas y otros insectos. Ya en el siglo XIX, científicos europeos y norteamericanos emplearon depredadores naturales (catarinas y avispas) y patógenos (hongos) para proteger cultivos y bosques, obteniendo resultados muy alentadores (Torres, 2002). Esta manipulación intencional de poblaciones de enemigos naturales dio como resultado lo que conocemos como control biológico.

En 1964 se definió a dicho control como la acción de parásitos, predadores y patógenos para mantener a otra población de organismos a una densidad más baja en promedio, posteriormente en 1987 se redefine este concepto como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente, genes o sus productos para reducir los efectos de los organismos plaga (Galán, 1996). Estos microorganismos, denominados entomopatógenos, son específicos: afectan sólo a determinados grupos de insectos (hospederos) y son inofensivos para insectos benéficos, humanos y otros organismos superiores.

Para que un microorganismo entomopatógeno o su producto sea considerado como un agente potencial para utilizarse en el control biológico, debe cumplir con las siguientes características (Aizawa, 1974):

1. Efectivo y específico contra el insecto blanco y consistente en la supresión de las poblaciones de la plaga.
2. Disponibilidad y factibilidad de una tecnología de producción continúa.
3. Estar disponibles en formulaciones que posean una vida de anaquel larga, ser estable en el hábitat del insecto blanco y diseminarse bien para maximizar el contacto.
4. No ser infeccioso o tóxico para el ser humano y su efecto en flora y fauna no blanco debe ser mínimo.
5. Poseer potencial comercial.

Muchos de los organismos entomopatógenos potenciales a ser usados por el hombre en el control de densidades de poblaciones de insectos pertenecen a diferentes grupos taxonómicos, principalmente hongos, bacterias, nematodos y virus. Sin embargo, hasta el momento, solo unos pocos han sido desarrollados como principio activo de productos insecticidas. De todos ellos, los más utilizados y extendidos comercialmente en el mundo son, sin duda, los basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (De Luna, 2002).

La historia acerca de *Bacillus thuringiensis* da comienzo a inicios del siglo pasado, cuando fue aislado en Japón, por Ishiwata, y se le consideró el microorganismo responsable de la enfermedad de sotto del gusano de seda *Bombyx mori* (Rodríguez, 1996). Diez años más tarde, fue redescubierto un organismo similar por Berliner de la ninfa de larvas de *Anagasta kuehniella*, en Alemania. El investigador alemán lo llamó *Bacillus thuringiensis*, debido a que el microorganismo fue aislado en Turingia, Alemania, y con el cual en la actualidad se le reconoce. Berliner reportó la presencia de un cuerpo paraesporal, sin embargo no lo relacionó con la actividad tóxica del microorganismo (De Luna, 2002). Fue hasta 1915 en que un grupo de investigadores japoneses encontró que solo los cultivos esporulados eran tóxicos para larvas del gusano de seda. Ellos sugerían que la toxicidad observada se debía a la acción de las toxinas (Lambert, 1992).

El primer producto comercial llamado Sporeine® fue desarrollado en 1938, por el laboratorio Libec de Francia, disponible para el control del gusano barrenador de la harina (Aronson *et al.*, 1986). Infortunadamente, este producto se usó por un corto periodo debido a la Segunda Guerra Mundial (De Luna, 2002).

En 1969 el Dr. H.T. Dulmage aisló en Estados Unidos una cepa de *B. thuringiensis* que resultó de 20 a 200 veces más potente que todas las especies conocidas, a la que denominó *B. thuringiensis* variedad *kurstaki* (HD-1), siendo eventualmente adoptado como ingrediente activo para productos comerciales (Couch, 1978).

Durante muchos años se pensó que *B. thuringiensis* era un patógeno de lepidópteros porque solo se aislaron cepas activas contra este tipo de insectos. En 1978, se encontró una bacteria *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* capaz de matar mosquitos y en 1983 una *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* activa contra insectos coleópteros (Schnepf, 1998). Fue a partir de entonces que un gran número de investigadores en todo el mundo se dedicó a buscar más de estas bacterias y se han encontrado una gran diversidad de estas, las cuales se han caracterizado por su serotipo H-flagelar es decir por las proteínas presentes en el flagelo en más de 45 serotipos y 58 serovariedades diferentes (Rodríguez, 1996).

MORFOLOGÍA

La bacteria *Bacillus thuringiensis* perteneciente a la familia *Bacillaceae*, es un bacilo gram-positivo, con un tamaño promedio de 2 a 5 µm por 1 a 1.2 µm, flagelos

peritrícos y esporulado que se caracteriza por la formación de un cuerpo paraesporal o cristal de proteína, conocido como delta-endotoxina, estos cristales se forman durante la esporulación y tienen actividad tóxica para larvas de insectos (Shieh, 1988). A *B. thuringiensis* se le considera cosmopolita, pues sus esporas se han aislado de suelo (Meadows *et al.*, 1992), de larvas de insectos enfermos (Kaelin *et al.*, 1994), de productos almacenados (Karamanlidou *et al.*, 1991).

Los cristales están constituidos por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Bravo, 1992; Lorence, 1996).

***Bacillus thuringiensis* CONTRA NEMATODOS**

Bacillus thuringiensis es una bacteria la cual produce varios metabolitos insecticidas, puede producir compuestos tóxicos de varias estructuras químicas y propiedades (Leyns *et al.*, 1995; Mohammed *et al.*, 2008). Las proteínas tóxicas producidas por *Bacillus thuringiensis* en términos generales son las más usadas en insecticidas naturales en la agricultura. Estas toxinas son usadas por los granjeros orgánicos, ofrecen una notable alternativa a los pesticidas químicos ya que no son tóxicos para los vertebrados, son más benignos al ambiente, y por medio de la ingeniería genética pueden ser introducidas a los cultivos para proveer una constante protección (Ziquan *et al.*, 2008). Más de 300 genes *cry* que codifican para una variedad de proteínas Cry han sido clonados y caracterizados de *Bacillus thuringiensis*. Las toxinas Cry han sido clasificadas como pertenecientes a la familias Cry1 a Cry51 en base a su homología en la secuencia de aminoácidos (Ziquan *et al.*, 2008). A la fecha a seis

proteínas Cry (Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21) se les conoce su actividad tóxica para larvas de nematodos de vida libre o parásitos (Wei *et al.*, 2003; Mohammed *et al.*, 2008).

La mayoría de los estudios probando *Bacillus thuringiensis* para el control biológico de nematodos se han enfocado en zooparásitos y nematodos de vida libre (Carneiro *et al.*, 1998). Durante la última década se han realizado intensos estudios de los efectos nematocidas de *Bacillus thuringiensis* principalmente dirigidos al desarrollo de preparaciones bacterianas efectivas contra nematodos fitoparásitos (Mohammed *et al.*, 2008).

Jacq *et al.* (1977) encontraron una toxina termolabile de *Bt* tóxica a poblaciones de *Meloidogyne*, *Panagrellus* y *Aphelenchus*.

Zuckerman *et al.* (1993) reportaron que una cepa de *Bt* (CR-371) causaba reducción significativa en agallas de tomate en ensayo de invernadero.

Leyns *et al.* (1994) comprobaron la actividad nematocida de mezclas de esporas y cristales de tres aislados de *Bt* contra estadios juveniles y adultos de *Caenorhabditis elegans*.

Carneiro *et al.* (1998) probaron 21 cepas de *Bacillus* spp. contra *Meloidogyne javanica* usando el sobrenadante, donde la cepa *Bt brasiliensis* resultó efectiva en matar los juveniles y las cepas *Bt aizawai* y *Bt morrisoni* resultaron efectivas para inmovilizarlos.

Márquez and Fernández (2006) probaron el efecto de la mezcla de esporas y cristales y los sobrenadantes de 37 cepas de *Bt* contra *Meloidogyne incognita*, las cepas que mostraron mejor actividad fueron *kurstaki*, *morrisoni* e *israelensis*. La fracción tóxica más efectiva fue el sobrenadante que contiene las exotoxinas termoestables.

Diferentes estudios con los sobrenadantes de los cultivos de *Bacillus* indican que enzimas catabólicas (proteasas, quitinasas y glucanasas), péptidos antibióticos o pequeñas moléculas secretadas por las especies de *Bacillus* pueden contribuir a la actividad contra nematodos fitopatógenos (Márquez and Fernández 2006; Lian *et al.*,

2007; Mohammed *et al.*, 2008). Varias proteasas bacterianas han demostrado estar involucradas en procesos de infección a nematodos, la proteasa alcalina extracelular de *Brevibacillus laterosporus* (Huang *et al.*, 2005). La Serin proteasa de *Bacillus nematocida* (Niu *et al.*, 2005), La proteasa aprA de *Pseudomonas fluorescens* (Siddiqui *et al.*, 2005), *Bacillus firmus* forma la base de un bionematicida comercial (Cox *et al.*, 1981). En investigaciones recientes se encontraron varias especies del género *Bacillus* son capaces de producir proteasas pueden suprimir las poblaciones del nematodos fitopatógenos *Panagrellus redivivus*, debido a la presencia de toxinas extracelulares que son capaces de degradar la cutícula de estos nematodos (Lian *et al.*, 2007).

Mohammed *et al.* (2008) investigaron el potencial nematicida de las proteínas cristal y las proteínas vegetativas de los sobrenadantes de 10 aislados de *Bt in vitro* contra *Meloidogyne incognita* además de la actividad *in vivo* usando plantas de tomate como hospedero. La cepa *sotto* resulto con las actividades nematicidas más altas en los ensayos con proteínas cristal y las proteínas vegetativas.

Meloidogyne incognita.

Taxonomía (Pierre *et al.*, 2003)

- Reino: Animalia
- Phylum: Nematoda
- Orden: Tylenchida
- Familia: Heteroderidae
- Género: *Meloidogyne*
- Especie: *Meloidogyne incognita*

Los nematodos son organismos microscópicos no segmentados que constituyen el grupo más abundante de animales multicelulares en la tierra, en la que ocupan la mayoría de hábitats. Existen nematodos bacterívoros, fungívoros, predadores de otros nematodos, parásitos de insectos y herbívoros o parásitos de plantas. Estos últimos causan importantes daños en los cultivos y a ellos nos referiremos principalmente en este documento. Debido a su pequeño tamaño y a que viven en el suelo, no pueden verse a simple vista y su estudio eficaz sólo ha sido posible cuando la disponibilidad de microscopios de alta resolución y al uso de técnicas para extraerlos del suelo, permitió estudios cuantitativos sobre sus densidades de población y correlaciones con los daños producidos en los cultivos. Suelen tener forma de hilo, con una longitud de 0,1 a 3 mm y un diámetro unas 20 veces menor que su longitud. Están recubiertos de una cutícula protectora y lo más llamativo de su organografía es el tubo digestivo, compuesto esquemáticamente por un estilete, esófago, intestino y ano. Los adultos son fácilmente identificables por la presencia de un sistema reproductor. Las hembras presentan uno o dos ovarios, útero, vagina y vulva y una o dos espermatecas. Los machos se distinguen

fácilmente por la presencia de un aparato copulador en la cola, compuesto por espículas, gubernáculo y alas caudales (Zuckerman *et al.*, 1990; Agrios, 2008).

Los efectos de los nematodos parásitos de plantas (fitoparásitos) sobre los cultivos se subestiman frecuentemente por agricultores y técnicos agrícolas debido a los síntomas inespecíficos que producen, que suelen confundirse con desordenes nutricionales, estrés hídrico, problemas de fertilidad del suelo, así como con otras infecciones secundarias causadas por hongos y bacterias, cuya entrada suele estar facilitada por la acción del nematodo. Estimaciones de diversas fuentes sugieren que los nematodos parásitos de plantas reducen la producción agrícola mundial entre un 12% y un 20% (Zuckerman *et al.*, 1990; Pierre *et al.*, 2003).

Tabla 1. Síntomas y cultivos susceptibles a los principales nematodos fitoparásitos

<i>Meloidogyne</i>	Agallas en raíces Debilitamiento general de la planta	Cereales, Frutales, Hortícolas, Industriales, Ornamentales
<i>Pratylenchus</i>	Lesiones y destrucción de raíces Debilitamiento general de la planta	Cereales, Frutales, Hortícolas, Leguminosas, Ornamentales
<i>Globodera; Heterodera</i>	Cuentas de collar en raíces Debilitamiento general de la planta	Cereales, Hortícolas (Patata), Industriales (Remolacha)
<i>Ditylenchus</i>	Distorsiones en hojas y bulbos	Hortícolas (Cebolla, Ajo)
<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Debilitamiento general de la planta	Cítricos
<i>Xiphinema; Longidorus</i>	Debilitamiento general de la planta Transmisores de virus	Frutales, Viñedo
<i>Trichodorus; Paratrichodorus</i>	Debilitamiento general de la planta Transmisores de virus	Numerosos cultivos
<i>Aphelenchoides</i>	Distorsiones y necrosis en las hojas	Ornamentales, Fresa
<i>Anguina</i>	Distorsiones en espigas y granos	Cereales, Pastos

Los nematodos del género *Meloidogyne* spp. son ampliamente conocidos por la habilidad de producir cambios en el sistema radicular de las plantas, induciendo la pérdida de absorción de nutrientes. La absorción de nutrientes se limita por la alteración fisiológica de la raíz, el metabolismo para generar fuente de alimento se interrumpe y como efecto de esto la planta reduce su crecimiento (enanismo) y su producción baja ocasionando grandes pérdidas en cultivos (Agrios, 2008).

Los nematodos del género *Meloidogyne* spp. están distribuidos desde los 5 a 30 cm debajo de la superficie del suelo, poseen tres etapas en su ciclo de vida: huevo, tres estadios larvales y adulto, la etapa infectiva es durante el segundo y tercer estadio larval. En esta etapa se movilizan a través de los poros del suelo húmedo (Sasser and Taylor, 1983).

Los síntomas primarios en las raíces son hinchamientos y agallas en las raíces primarias y menor cantidad de raíces secundarias y terciarias, conforme la larva se va alimentando secreta una sustancia llamada oxido-reductasa, la cual afecta a las células de las raíces provocando el desarrollo de células gigantes llamadas sincitos; causada por una multiplicación desordenada del núcleo denominado hiperplasia alrededor de la cabeza de la larva, produciendo síntomas secundarios como amarillamiento en las partes aéreas de la planta, hojas más angostas, detención del crecimiento de la planta y menor producción, con pérdidas hasta del 57 % (De Waele and Davide, 1998).

Distribución

Meloidogyne spp. se distribuye mundialmente y no se conoce bien su lugar de origen. Estos nematodos tienen un amplio rango de hospedantes, especialmente plantas dicotiledóneas, que a menudo se encuentran en las áreas donde se cultivan Musáceas (De Waele and Davide, 1998).

Morfología

Los machos, las hembras y las larvas de *Meloidogyne* spp. tienen estiletes que consisten en una punta cónica, una columna derecha y tres nódulos. El estilete puede ser sacado por medio de músculos adheridos a los nódulos. Es usado para perforar las células de las plantas. El estilete tiene una abertura cerca de la punta que conduce al lumen del estilete que es continuado con el lumen del esófago adherido a los nódulos, el lumen tiene una ramificación corta llamada orificio de la glándula dorsal (OGD). Los músculos adheridos a la válvula la dilatan y contraen alternativamente, de modo que funciona como una bomba, trasladando el alimento al intestino. Para alimentarse, el nematodo empuja la punta del estilete dentro de la célula de la planta. Las secreciones de la glándula dorsal esofágica fluyen a través de la abertura del estilete hacia el interior de la célula de la planta. Esta secreción y posiblemente las secreciones de las dos glándulas subventrales tienen un gran efecto en la planta (Pierre *et al.*, 2003).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de la especie de *Meloidogyne* spp. (Figura 1) comienza con un huevo, generalmente en estado unicelular, depositado por una hembra que está completa o parcialmente incrustada en una raíz del hospedero. Los huevos son depositados en una matriz gelatinosa que los mantiene juntos en masas o sacos de huevos. El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2, 4, 8 ó más células, hasta que se ve una larva completamente formada, con un estilete, enrollada en la membrana del huevo. La primera muda tiene lugar en el huevo y no es difícil ver separada la cutícula del primer estadio, sobresaliendo más allá de la cabeza del segundo estadio larval. Poco después la larva emerge de un agujero hecho en un extremo del cascarón flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete (Sasser and Taylor, 1983).

La larva del segundo estadio larval que ha emergido puede dejar o no dejar inmediatamente la masa de huevos. Generalmente hay varias larvas emergidas en la masa de huevos junto a huevos en varios estados de desarrollo. Después de dejar la masa de huevos, la larva se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la que pueda alimentarse. Parece que la búsqueda es al azar hasta que la larva se acerca a unos cuantos centímetros de una raíz. Luego guiado por alguna sustancia que emana de la raíz, se va trasladando directamente hacia la punta radicular. Las larvas de segundo estadio larval infectivo generalmente penetran en la raíz justamente sobre la caliptra. Se mueven principalmente entre las células no diferenciadas de la raíz y finalmente se colocan con sus cabezas en el cilindro central de desarrollo. Esto da lugar a la formación de células gigantes llamadas sincitos, formadas por un agrandamiento de las células conocido por hipertrofia. Al mismo tiempo, hay una intensa multiplicación de células

vegetales denominado hiperplasia alrededor de la cabeza de la larva (Sasser and Taylor, 1983).

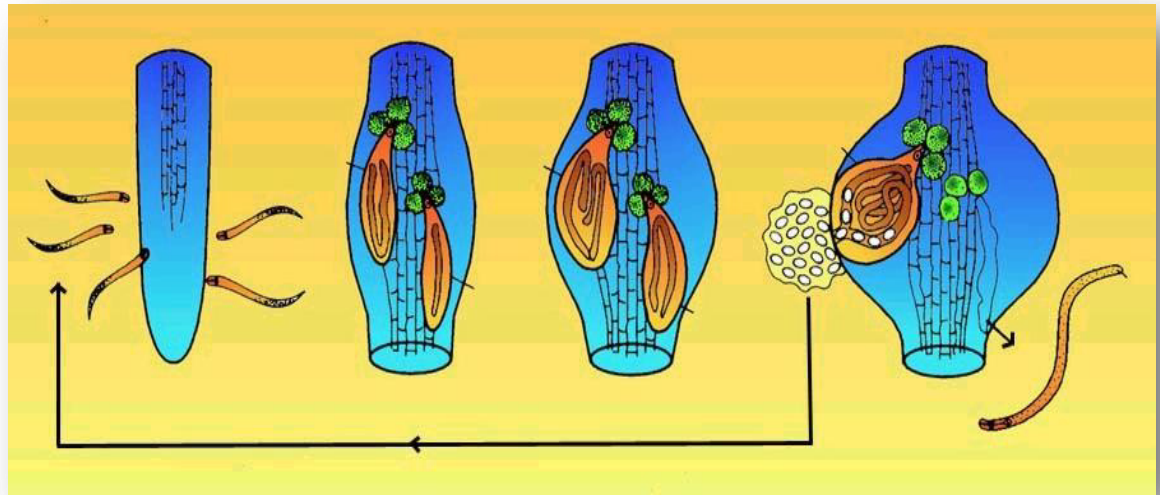


Figura 1. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. Juveniles de segunda etapa (J_2) eclosionan de los huevos en el suelo e invaden los tejidos de la raíz. Los machos permanecen vermiformes y abandonan la raíz. Después de la maduración las hembras se vuelven piriformes y depositan los huevos en una masa gelatinosa afuera de la raíz.

Identificación de especies

Los nematodos son considerados entre los animales más difíciles de identificar, el uso de marcadores genéticos basados en el ADN ribosomal (ADNr) ha ganado aceptación en aplicaciones que van desde las determinaciones de cuarentena a las evaluaciones de la biodiversidad.

Aunque existen aproximadamente 60 especies descritas de nematodos formadores de nódulos de la raíz, la atención taxonómica se ha enfocado en seis (*Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919, *M. javanica* Treub, 1885, *M. arenaria* Neal, 1889, *M. chitwoodi* Golden *et al.*, 1980, *M. fallax* Karssen, 1996 y *M. hapla* Chitwood, 1949) ya que están asociadas típicamente con enfermedades de plantas agrónomicamente importantes (Adam *et al.*, 2007). Para la identificación de especies y poblaciones de *Meloidogyne* se han aplicado varios métodos aunque todos tienen sus limitaciones (Zijlstra *et al.*, 1995). Es importante determinar la composición de especies de *Meloidogyne* en cultivos para poder introducir estrategias de control no químicas, como la rotación de cultivos resistentes y plantas enemigas (Cenis, 1993; Orui, 1998). La identificación de especies de *Meloidogyne* está basada en la morfología de las hembras adultas (Eisenback *et al.*, 1981) y rango de hospederos (Williamson *et al.*, 1997), siendo difícil la identificación para machos y hembras juveniles así como para los machos adultos. También se utiliza el análisis de isoenzimas, donde la comparación de patrones de esterasa muestran gran consistencia en la separación de las 4 especies de mayor distribución en el mundo, sin embargo no detecta variación intraespecífica entre nematodos de *Meloidogyne* (Volvas *et al.*, 2005). Los diagnósticos basados en ADN proveen atractivas soluciones a los problemas asociados con estos métodos de

identificación, ya que son independientes tanto de los productos expresados del genoma como de la influencia del ambiente y la etapa del desarrollo (Wishart *et al.*, 2002; Powers, 2004). La mayoría de los análisis de ADN dirigidos a nematodos formadores de agallas usan ADN total (genómico y mitocondrial [ADNmt]) o ADNmt y son predominantemente a través de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs por sus siglas en inglés) (Zijlstra *et al.*, 1995; Orui, 1998; Powers, 2004). La comparación de secuencias de regiones espaciadoras transcritas internas (ITS, por sus siglas en inglés) de ADN ribosomal (ADNr) es usada en taxonomía, ya que tiene un alto grado de polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas y es prácticamente constante para una especie específica. Además las regiones ITS son flanqueadas por secuencias conservadas que facilitan el diseño de iniciadores para su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

En México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) ha reportado la presencia del nematodo *Meloidogyne incognita* y se considera como una plaga importante para el Estado de Nuevo León. *M. incognita* es un nematodo que no está regulado en Normas Oficiales Mexicanas y no se menciona en el Módulo de Requisitos Fitosanitarios para la importación de mercancías reguladas (SENASICA-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas 2014).

El control de *M. incognita* se lleva a cabo en gran medida por la combinación de métodos incluyendo el uso de nematicidas y rotación de cultivos. Aunque los nematicidas químicos son efectivos hasta cierto punto, su uso ha sido cuestionado en los últimos años debido a la creciente preocupación acerca de la contaminación ambiental y los riesgos para la salud humana (Seo *et al.*, 2011).

MATERIAL MÉTODO

1. CULTIVO DE *Meloidogyne*

Las poblaciones de *Meloidogyne* se obtuvieron del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, e identificadas por el M.C. Nabor González de acuerdo a los criterios de Zuckerman *et al.*, 1990. Las poblaciones de nematodos se propagaron y mantuvieron por subcultivos en pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y belén (*Impatiens sultanii*) en invernadero a 22-28 °C (Carneiro, 1998).

Todas las semillas utilizadas se esterilizaron en su superficie sumergiéndolas en etanol por 5 minutos, transferidas a hipoclorito de sodio 1% por 10 min y lavadas en agua estéril (Mitkowski and Abawi, 2002). Las semillas se cultivaron en suelo esterilizado en autoclave a 120°C por 15 min, a los 10 días se inocularon con larvas juveniles de *Meloidogyne*, a los 30 días las raíces de las plantas fueron extraídas y se retiraron manualmente los nódulos y masas de huevecillos. Las masas de huevecillos fueron enjuagadas en hipoclorito de sodio al 0.5% por 10 min, posteriormente se lavaron con agua estéril y finalmente se incubaron en agua estéril a 25 °C.

Todos los nematodos usados en los bioensayos provenían de estos cultivos.

2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE DEL GÉNERO *Meloidogyne*

Material biológico

Los juveniles activos (J₂) de *Meloidogyne* se obtuvieron usando la técnica del embudo de Bearmann (Agrios, 2005) de plantas contaminadas, proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, e identificadas como género *Meloidogyne* por claves taxonómicas para la identificación de nematodos parásitos de plantas (Zuckerman *et al.*, 1990).

Identificación Molecular de la especie del nematodo

El ADN genómico se aisló de 5000 nematodos (J₂) usando una lisis con detergentes seguido por una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook and Russell, 2001). Los especímenes se recolectaron por centrifugación a 16,000 g por 5 min, y el pellet se resuspendió en 200 µL de amortiguador lisis TSNT (2 % Tritón X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8), 500 µL de fenol saturado con Tris-HCl y 100 µL de una mezcla cloroformo: alcohol

isoamflico (24:1). La suspensión se mezcló en vortex por 5 min y se agregaron 200 μL de amortiguador TE 1X (10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8.0); las fases se separaron por centrifugación a 16,000 g por 10 min y el ADN se precipitó de la fase acuosa con etanol. Los pellets de ADN se secaron y resuspendieron en 48 μL de amortiguador TE, 2 μL de 2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ RNasa y cuantificaron por densitometría en geles de agarosa teñidos con solución GelRed 1X (Biotium, Hayward, CA) usando el sistema EDAS 290 y el programa Kodak Digital Science 1D (Eastman Kodak Company, Rochester, New York).

Un fragmento ADN_r fue amplificado por PCR usando el iniciador ITS1 (5'-TTGAACCGGGCAAAGTCG-3') y el iniciador reverse ITS2(5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') dirigidos a las regiones 3' y 5' del ADN_r 18S y 28S, respectivamente (Stock *et al.*, 2001). La PCR se realizó en un termociclador TC020-24 MultiGene Mini (Labnet International, Inc., Edison, NJ) en un volumen de 25 μL conteniendo 1X buffer GoTaq PCR (Promega, Madison, WI), 200 ng de ADN genómico, 200 μM de cada dNTPs, 0.5 μM de cada iniciador, agua estéril y 1 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI). Se usó un programa de amplificación de 32 ciclos: 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 75 s, con una primera etapa de desnaturalización de 94 °C por 3 min y una etapa final de elongación de 72 °C por 5 min. Un plásmido que contiene un fragmento las regiones ITS de *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David 1992, (pGEMITSLZO), se usó como testigo positivo de la PCR. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de electroforesis de agarosa 2.5 % teñido con solución GelRed 1X, usando una unidad de electroforesis horizontal MSMUNIDUO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 100 volts por 60 min, y el producto del amplificado se clonó en el vector pGEM®-T (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de la ligación se usó para transformar células de *Escherichia coli* DH5 α , células transformadas se seleccionaron por una prueba azul-blanco en placas de agar LB con ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 100 μL IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (2 mg mL $^{-1}$). Las colonias resultantes de las células transformados se analizaron para detectar la presencia del ADN plasmídico mediante una extracción por lisis alcalina y en un gel de agarosa 0.8 % teñido con solución GelRed 1X. Además,

la correcta inserción del producto amplificado en el vector pGEM®-T se confirmó por PCR usando los iniciadores ITS1 y ITS2, tal como se describió anteriormente.

Seis plásmidos positivos por PCR de diferentes colonias de *E. coli* se secuenciaron usando los iniciadores T7 y SP6 (Promega) y un analizador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

Las secuencias T7 y SP6 (12 secuencias en total) se alinearon usando el módulo Contig Assembly Program del programa BioEdit v7.0.8.0 (Hall, 1999) y la secuencia consenso se comparó con secuencias nucleotídicas en bases de datos usando la herramienta nucleotide BLAST (BLASTn) del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). El género y especie del organismo con la secuencia nucleotídica de mayor identidad a la secuencia consenso se consideró como el género y especie del nematodo analizado.

3. SELECCIÓN DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*

Activación de cepas de *Bacillus thuringiensis*

En base a reportes de literatura se activaron 25 cepas de *Bt* con posible actividad nematocida pertenecientes a la Colección del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, conservadas en agar semisólido o liofilizados. Las cepas se activaron procediendo de acuerdo al método de conservación. Para determinar la presencia de esporas y cristales típicos de la especie, se realizaron tinciones simples con cristal violeta y se observaron las características morfológicas al microscopio de disección 40X. Se descartaron 2 cepas que no presentaban la presencia de los cristales típicos de *Bt*. las cuales fueron descartadas (HD-570 y GM-96).

Preparación de cultivos

Todas las cepas se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 ml en 100 ml de caldo nutritivo y se incubaron 30 °C en un agitador rotatorio a 140 rpm por 3 días (cultivo completo) Las muestras para los bioensayos se ajustaron hasta obtener caldos a una concentración de 10^7 esporas por ml.

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE CULTIVOS COMPLETOS DE *Bacillus thuringiensis* IN VITRO.

Para las 23 cepas se realizó el bioensayo en cajas de 24 pozos de acuerdo al método estándar de Prasad *et al.* (1972). Un ml de cada cultivo completo se agregó a 200 μ l de una suspensión de nematodos J₂ (alrededor de 15 J₂) complementada con antibiótico (Penicilina 50 μ g/ml) en cada pozo e incubado a temperatura ambiente. Caldo nutritivo y agua destilada con antibiótico se utilizaron como control, todos los tratamientos tuvieron 3 réplicas. El número de J₂ activos y muertos se contaron en el estereoscopio a las 24 h y se determinó el porcentaje de mortalidad de cada cepa. Se seleccionaron las cepas que presentaron actividad nematicida superior al 60%.

5. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CRISTAL DE CULTIVOS DE LAS CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*

Para obtener las proteínas cristal de las 14 cepas que presentaron actividad nematocida superior al 60% para los bioensayos se centrifugaron cultivos de *Bt* de 72 hrs a 8000 rpm por 15 min, el pellet se lavó 3 veces con agua destilada. 50 mg de este pellet se disolvió en 20 ml de una solución 100 mmol de Na₂CO₃ (pH 9.5) adicionado con 10 mmol DTT, agitados durante 2 horas a temperatura ambiente y centrifugados a 15000 rpm por 15 min, los sobrenadantes con la proteína cristal solubilizada se dializaron (Mohammed *et al.*, 2008). Los dializados fueron conservados a -10°C hasta su uso.

6. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LAS CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*.

Las 14 cepas que presentaron actividad nematocida superior al 60% fueron inoculadas en matraces Erlenmeyer de 500 ml en 100 ml de caldo nutritivo a 30 °C en un agitador rotatorio a 140 rpm por 3 días. Las muestras para los bioensayos fueron ajustadas hasta obtener caldos a una concentración de 10⁷ esporas por ml. Para obtener los sobrenadantes los cultivos fueron centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos, posteriormente filtrados a través de una membrana Millipore (0.20 µm). (Lian *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2008). Los filtrados fueron conservados a -10°C hasta su uso.

7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL IN VITRO.

Diferentes concentraciones (30, 15 y 7 $\mu\text{g/ml}$) de las proteínas cristal de las 14 cepas de *Bt* fueron preparadas. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando Suero de albumina como estándar. Se realizaron bioensayos en cajas de 24 pozos como se describió anteriormente. Una solución con 100 mmol Na_2CO_3 (pH 9.5) y 10 mmol DTT se usó como tratamiento control. El número de J_2 activos y muertos se contaron en el estereoscopio a las 24 h para determinar el porcentaje de mortalidad de cada cepa.

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE LAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES IN VITRO.

Para determinar la presencia de proteínas extracelulares con actividad nematicida de los diferentes cultivos de *Bt* se depositó en placas de 24 pozos, un mililitro de cada sobrenadante complementado con antibiótico (Penicilina 50 $\mu\text{g/ml}$) junto con 200 μl de una suspensión de nematodos (18 J_2). Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 24 h. Caldo nutritivo y agua destilada con antibiótico fueron utilizados como control, todos los tratamientos tuvieron 3 réplicas. El número de J_2 activos y muertos se contaron en el estereoscopio a las 24 h para determinar el porcentaje de mortalidad de cada cepa.

9. EVALUACIÓN DE LAS CEPAS QUE PRESENTARON MEJORES RESULTADOS A NIVEL INVERNADERO UTILIZANDO PLANTAS DE BELÉN (*Impatiens sultanii*) INFESTADAS CON *Meloidogyne incognita*.

La actividad nematocida de 4 cepas de *Bt* fue probada contra nematodos habitantes de la rizósfera de plantas de Belén. Las semillas utilizadas se esterilizaron en su superficie sumergiéndolas en etanol por 5 minutos, transferidas a hipoclorito de sodio 1% por 10 min y lavadas en agua estéril (Mitkowski and Abawi, 2002) se sembraron en macetas de 12 cm de diámetro y 15 cm de profundidad, las cuales se llenaron con 1 kg de tierra pasteurizada. Tres plántulas por maceta. A todas las macetas con plántulas de 2 semanas de edad se les aplicó una suspensión de huevos de nematodos ajustada a 10000 huevos por maceta. Después de la inoculación con nematodos, cada cepa de *Bt* fue aplicada en tres tratamientos: cultivo completo, sobrenadante (filtrado) y complejo espora cristal (dializado). Se aplicaron 200 ml de cada tratamiento y se utilizaron 5 réplicas por tratamiento. 5 macetas se dejaron sin tratamiento de bacterias (*Bt*) y estas sirvieron como control. Las macetas se mantuvieron 2 meses en invernadero.

Se colectaron los sistemas radiculares y se evaluó el número de agallas por sistema radicular para reportar el porcentaje de reducción en el número de nódulos y número de masas de huevecillos (Di Vito *et al.*, 2004; Volvas *et al.*, 2005; Satoshi *et al.*, 2008; Ntalli *et al.*, 2009).

10. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE SOBRENADANTES QUE PRESENTARON MAYOR ACTIVIDAD TÓXICA CONTRA *Meloidogyne incognita*.

Se evaluó la actividad proteolítica de 4 cepas empleando el método de hidrólisis en Agar (Sánchez *et al.*, 2004; Sharmin *et al.*, 2005; Khosravi-Darani *et al.*, 2008). Se utilizó como medio Agar, métodos estándar suplementado con 1% de leche descremada. Cultivos de las de 24 hse sembraron por picadura y se incubaron a 28-30° C por 48 h. La capacidad hidrolítica de las cepas se reconoció mediante la formación de halos traslúcidos alrededor de las colonias.

Para la caracterización del sobrenadante de las cepas que mostraron mejor actividad nematocida en cultivo completo se realizó precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación, la proteína fue colectada por centrifugación a 15000 rpm por 25 minutos y los pellets de proteína fueron disueltos en PBS 100 mmol, después dializados toda la noche contra PBS 100 mmol a 4°C. Las proteínas colectadas fueron evaluadas en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%, después de la electroforesis los geles fueron teñidos y fijados en 40% de metanol, 10% de ácido acético y azul de coomassie (0.1%) alrededor de 12 horas y desteñido en 40% metanol y 10% de ácido acético por 2 horas con agitación (Lian *et al.*, 2007).

La actividad proteolítica de las proteínas colectadas fueron determinadas por un ensayo de hidrólisis de caseína con el kit comercial QuantiCleave Protease Assay (Thermo scientific) por triplicado.

11. IDENTIFICACIÓN DE GENES *cry* PRESENTES EN LAS CEPAS CON MAYOR ACTIVIDAD TÓXICA CONTRA *Meloidogyne incognita*.

Para la detección de seis genes *cry* específicos contra nematodos *cry5*, *cry6*, *cry12*, *cry13*, *cry14* y *cry21* se sintetizaron seis pares de iniciadores específicos para regiones relacionadas con los genes de acuerdo a reportes anteriores (Ejiofor and Johnson 2002; Porcar and Juárez 2003; Gholamreza *et al.*, 2008) como control positivo se usó un iniciador para determinar una región 16S ARNr de *Bacillus thuringiensis* para verificar el ADN y los reactivos (Giffel *et al.*, 1997) Tabla 2.

La extracción de DNA total y purificación se siguió en base al protocolo de Cheng and Jiang (2006). Se centrifugó 1 ml de cultivo de las diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* a 8,000 rpm por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con 400 µl de buffer STE dos veces. Se centrifugaron las células 2 minutos a 8,000 rpm y se resuspendió el paquete celular en 200 µl de buffer TE. Se adicionaron 100 µl de Fenol Tris-saturado (pH 8.0) y se mezcló con vórtex por 60 segundos para lisar las células. Se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 5 minutos (4 °C), para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Se transfirieron 160 µl de la fase superior acuosa, a un tubo nuevo eppendorf de 1.5 ml. Se adicionaron 40 µl de buffer TE y se mezclaron con 100 µl de cloroformo. Se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C. Se purificó el lisado con las extracción por cloroformo hasta una interfaz sin residuos blancos (este procedimiento puede repetirse dos o tres veces). Se transfirieron 160 µl de la fase superior acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml. Se agregaron 5 µl de RNasa (10 mg/ml) y 40 µl de buffer TE. Se incubaron por 10 minutos a 37 °C para digerir el ARN. Se mezclaron con 100 µl de cloroformo y centrifugaron 5 minutos a

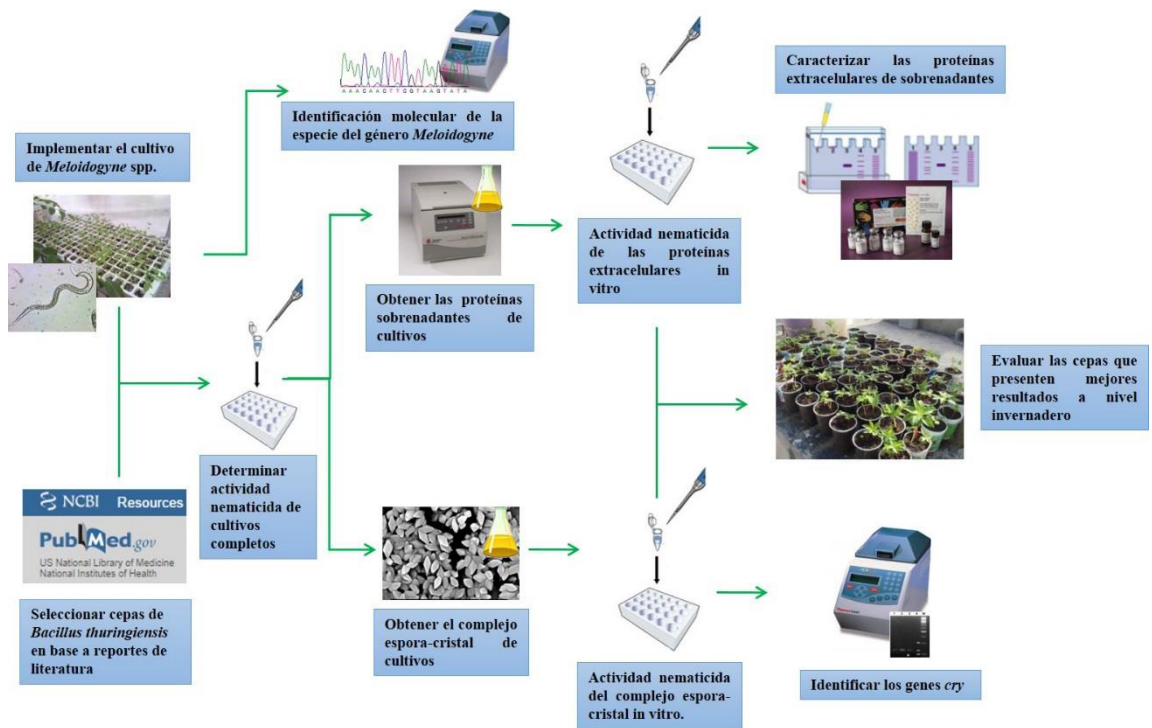
13,000 rpm (4°C). Se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml y almacenó a -20°C.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplearon los oligonucleótidos descritos anteriormente. Se utilizó un termociclador Veriti (Applied Biosystems) y un volumen de reacción de 25 µl conteniendo 125 ng de DNA, 0.2 mM de dNTPs cada uno, 1 µM de cada iniciador, 1 U GoTaq DNA polimerasa (Promega) y su amortiguador correspondiente. El programa de temperaturas estuvo constituido por 30 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 94°C por 1 minuto, 45°C por 45 segundos y 72°C 2 minutos, con un primer paso de desnaturalización de 94°C por 5 minutos y una elongación final a 72°C por 5 minutos. Los productos de la PCR fueron analizados en gel de electroforesis de agarosa 2%.

Tabla 2. Características de los iniciadores específicos para los genes *cry5*, *cry6*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry21* y *Bt16S*.

Primer	Secuencia 5´a 3´	# de bases	Tamaño de producto	TM	Número de acceso
<i>cry5</i> (+)	TAAGCAAAGCGCGTAACCTC	20		55.6 °C	
<i>cry5</i> (-)	GCTCCCCTCGATGTCAATG	19	322	55.7 °C	L07025
<i>cry6</i> (+)	TGGCGTAGAGGCTGTTCAAGTA	22		58.0 °C	
<i>cry6</i> (-)	TGTCGAGTTCATCATTAGCAGTGT	24	302	56.2 °C	L07022
<i>cry12</i> (+)	CTCCCCAACATTCCATCC	19		55.5 °C	
<i>cry12</i> (-)	AATTACTTACACGTGCCATACCTG	24	363	55.0 °C	L07027
<i>cry13</i> (+)	CTTTGATTATTTAGGTTTAGTTCAA	25		47.8 °C	
<i>cry13</i> (-)	TTGTAGTACAGGCTTGTGATTC	22	313	52.5 °C	L07023
<i>cry14</i> (+)	ATAATGCGCGACCTACTGTTGT	22		56.7 °C	
<i>cry14</i> (-)	TGCCGTTATCGCCGTTATT	19	456	54.7 °C	U13955
<i>cry21</i> (+)	ATACAGGGATAGGATTTCAAG	21		49.0 °C	
<i>cry21</i> (-)	ATCCCATTCTTCTATAAGTGTCT	23	453	51.3 °C	I32932
<i>Bt16S</i> (+)	GCGGCGTGCCTAATACATGC	20		53.7 °C	
<i>Bt16S</i> (-)	ATCTACGCATTTACCGCTAC	21	510	55.5 °C	

ESTRATEGIA GENERAL



RESULTADOS

CULTIVO DE *Meloidogyne*

La inoculación de poblaciones de *M. incognita* en las diferentes plantas hospederas, pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y belén (*Impatiens sultanii*) en condiciones de invernadero (Figura 2A), indicaron que el nematodo tuvo la capacidad de parasitar las 3 plantas, las cuales presentaron los nódulos en raíces característicos así como debilitamiento general de la planta (Figura 2B). Las raíces de las plantas fueron extraídas y se retiraron manualmente los nódulos y masas de huevecillos, los nematodos juveniles se extrajeron de la tierra usando la técnica del embudo de Bearman (Agrios, 2005) como se muestra en la Figura 3.

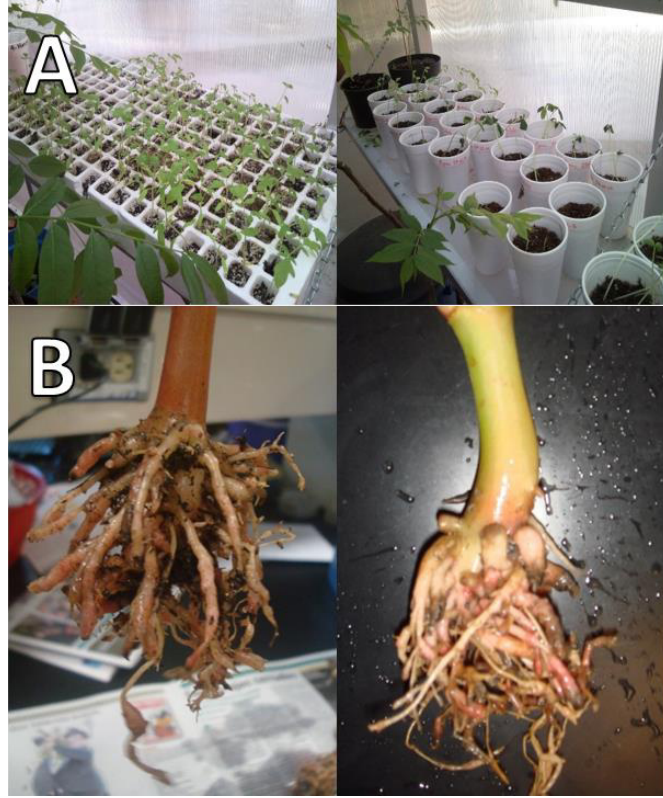


Figura 2. Plántulas de pepino, tomate y belén en condiciones de invernadero (22-28 °C) para subcultivos de poblaciones de *Meloidogyne incognita* (A). Nódulos en raíces de belén artificialmente infectadas con *Meloidogyne incognita* (B).



Figura 3. Extracción de nematodos juveniles utilizando la técnica del embudo de Bearman y extracción manual de huevecillos de raíces infectadas.

En la tabla 3 se muestran los promedios de diferentes parámetros para estimar la capacidad de infección de *Meloidogyne incognita* en las plantas utilizadas en este estudio. Las plantas de belén mostraron ser más susceptibles, las raíces más largas y gruesas permitían recuperar mayor cantidad de nódulos con masas de huevecillos con un promedio de 125 masas de huevecillos por planta.

Tabla 3. Efecto de *Meloidogyne incognita* en plantas de belén, pepino y tomate bajo condiciones de invernadero.

PLANTA	# de Nódulos	# de masas de huevecillos	# de huevecillos
Belén	212	125	87
Pepino	160	91	77
Tomate	130	85	82

Datos son promedios de 20 plantas

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE DEL GÉNERO *Meloidogyne*

El método de extracción de ADN produjo 25 μg de ADN genómico de alta calidad (DO260/DO280 1.9) sin aparente degradación como se muestra en el análisis de electroforesis en gel de agarosa de la Figura 4.

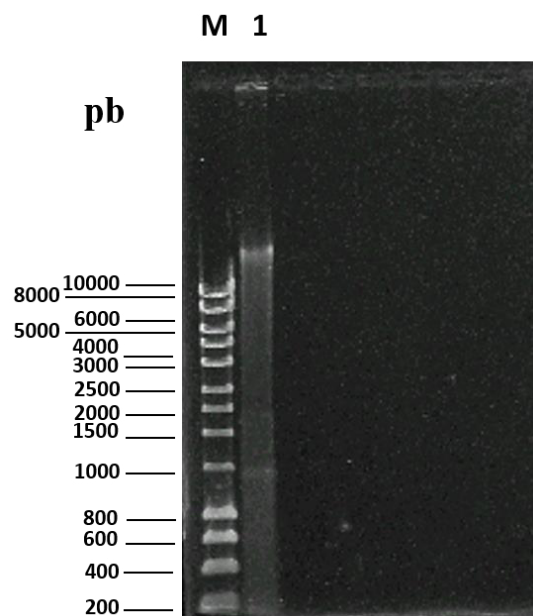


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE1X. Carril M marcador de tamaño molecular Hyperlader I. Carril 1 ADN genómico de nematodos juveniles con el método de TSNT.

El análisis en gel de agarosa para el producto amplificado por PCR de ADN genómico mostró una banda 608pb y mientras que para el control positivo (*H. indica*) se obtuvo una banda de 890pb (Figura 5).

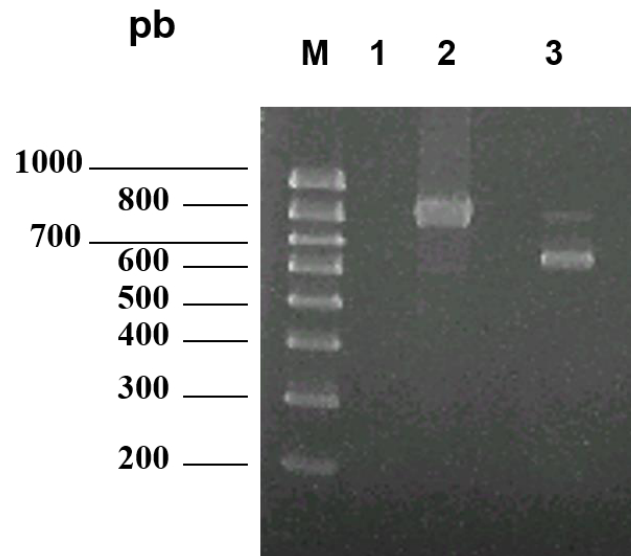


Figura 5. Producto de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de nematodos juveniles. Carril M, marcador de tamaño molecular Hyperlader IV (Bioline, London, UK); carril 1, control negativo; carril 2, control positivo (pGEMITSLZO); carril 3, el producto amplificado de 608 pb.

En la Figura 6 se muestra un gel de agarosa de los ADN's plasmídicos de 10 colonias provenientes de la transformación con el producto de la ligación de pGEM con el fragmento ITS. Claramente se pudo observar las distintas conformaciones características de los ADN's plasmídicos que corresponden a formas relajadas, enrolladas y superenrolladas. Así mismo también se observó su pureza en las preparaciones y la ausencia de ARN.

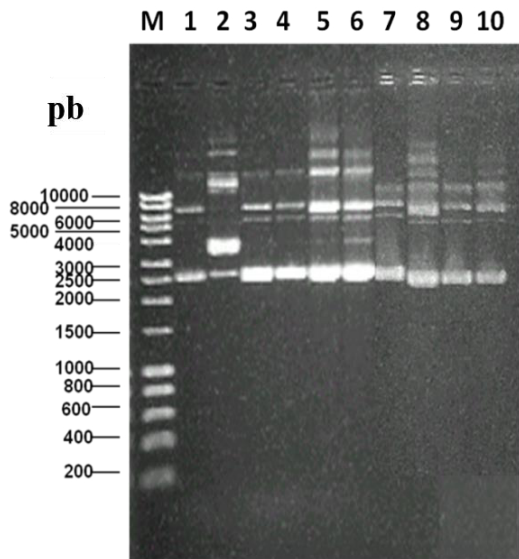


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE1X de la integridad del ADN plasmídico aislado de clonas transformadas con el producto de la ligación del vector pGEM y el fragmento ITS. Carril M marcador de tamaño molecular Hyperlader I. Carril 1-10 ADN plasmídico de 10 clonas obtenidas durante la transformación de *E.coli*DH5 α .

Del mismo modo, el análisis de PCR de 6 plásmidos de diferentes colonias de *E. coli* transformadas confirmó la presencia del fragmento de ADN_r dentro de los plásmidos extraídos (Figura 7).

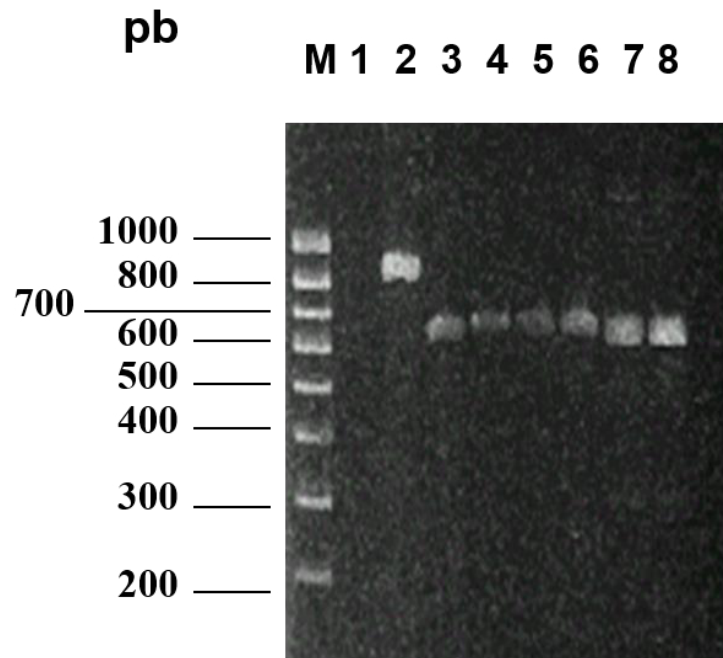


Figura 7. Productos de amplificación por PCR a partir de varios plásmidos de diferentes colonias de *E. coli* transformadas. Carril M, marcador de tamaño molecular Hyperlader IV (Bioline, London, UK); carril 1, control negativo; carril 2, control positivo (pGEMITSLZO); carriles 3-8, plásmidos de diferentes transformantes (608 pb).

>gb|AY438556.1| Meloidogyne incognita T1A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
 and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and
 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Length=768

```

Score = 1112 bits (602), Expect = 0.0
Identities = 606/608 (99%), Gaps = 0/608 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   TTGAACCGGGTAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATCATTAC 60
          |||
Sbjct 131  TTGAACCGGGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATCATTAC 190

Query 61   TTTATGTGATGTTCAAATTTGAATTCGCAATGAAATGATCGTTGTGAAACGGCTGTCGCT 120
          |||
Sbjct 191  TTTATGTGATGTTCAAATTTGAATTCGCAATGAAATGATCGTTGTGAAACGGCTGTCGCT 250

Query 121  GGTGTCTAAGTGTGCTGATACGGTTGTGAACGTCCTGGCTGATATATGTTGGTACATGT 180
          |||
Sbjct 251  GGTGTCTAAGTGTGCTGATACGGTTGTGAACGTCCTGGCTGATATATGTTGGTACATGT 310

Query 181  TAGGACTCTAATGAGTTTAAAGACCTAATGAGCCTCTTAAGTGAGGCCGCCAGCAACcttt 240
          |||
Sbjct 311  TAGGACTCTAATGAGTTTAAAGACCTAATGAGCCTCTTAAGTGAGGCCGCCAGCAACCTTT 370

Query 241  tttttCTCTACATTTTaaaaaaaaaCTAAAATTCACCCTTATCGGTGGATCACTAGGC 300
          |||
Sbjct 371  TTTTCTCTACATTTTAAAAAAAAAACTAAAATTCACCCTTATCGGTGGACCACTAGGC 430

Query 301  TCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCAAACCTGCGATAATTATTGCGAACTGCAGAAGTATTG 360
          |||
Sbjct 431  TCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCAAACCTGCGATAATTATTGCGAACTGCAGAAGTATTG 490

Query 361  AGCACAAAAGTTTTGAACGCAAATGGCCGATGAGGTCAAACCTCTTGCACGCTCTGGT 420
          |||
Sbjct 491  AGCACAAAAGTTTTGAACGCAAATGGCCGATGAGGTCAAACCTCTTGCACGCTCTGGT 550

Query 421  TCAGGGTCATTTTCTCTTATAGCGGAAGCTTTAATTTCTATAATGATGTTGTTGCTTTAT 480
          |||
Sbjct 551  TCAGGGTCATTTTCTCTTATAGCGGAAGCTTTAATTTCTATAATGATGTTGTTGCTTTAT 610

Query 481  ATTTTAAAAGGATTTTGTATTTCATGTATTAATCTAACTGTGAAAATCAAACAATTT 540
          |||
Sbjct 611  ATTTTAAAAGGATTTTGTATTTCATGTATTAATCTAACTGTGAAAATCAAACAATTT 670

Query 541  TGACCTGAACTCAGTCGAGACCCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAA 600
          |||
Sbjct 671  TGACCTGAACTCAGTCGAGACCCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAA 730

Query 601  GAAACTAA 608
          |||
Sbjct 731  GAAACTAA 738
  
```

Figura 9. Análisis BLASTn de la secuencia consenso de un fragmento de ADNr de nematodos juveniles amplificada por PCR (Query), que muestra el alineamiento con una secuencia de ADNr de *M. incognita* (Sbjct), código de GenBank AY438556.

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*

La selección de las cepas de se hizo en base a la literatura, serovariedades que presentaron actividad contra nematodos de vida libre, zooparásitos y fitoparásitos como *Meloidogyne*. Las serovariedades encontradas en la colección del Instituto de Biotecnología incluyeron: *kurstaki*, *israelensis*, *sotto*, *morrisoni* y *thuringiensis*. En total 25 cepas fueron activadas, las cuales se muestran en la Tabla 4, de esta lista 2 fueron descartadas por no presentar los cristales típicos de *Bt* (HD-570 y GM-96).

Tabla 4. Cepas de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes a la colección del Instituto de Biotecnología UANL FCB activadas.

Serovariedad	Cepas del Instituto de Biotecnología UANL
<i>kurstaki</i>	HD-1, HD-73, HD-162, HD-183, HD-187, HD-241, HD-263, HD-266, GM-34, GM-103
<i>israelensis</i>	HD-567, HD-570
<i>sotto</i>	HD-37, GM-3, GM-70, GM-96
<i>morrisoni</i>	HD-116, HD-324, HD-530, HD-559, HD-615, HD-652, GM-2
<i>thuringiensis</i>	HD-59, HD-63

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE CULTIVOS COMPLETOS DE *Bacillus thuringiensis* IN VITRO

La tabla 5 muestra el porcentaje de mortalidad de 23 cepas de *Bt* contra J₂ del nematodo *Meloidogyne incognita* utilizando el cultivo completo después de 24 h de incubación. Se tomó como mínimo una mortalidad de 60% para ser considerada como una buena actividad nematicida. 14 (60.86%) de 23 cepas mostró una mortalidad superior al 60%, para los siguientes bioensayos se descartaron 9 cepas debido a que la mortalidad fue inferior al 60% (GM-3, HD-63, GM-103, HD-162, HD-187, HD-266, HD-324, HD-559 y HD-567)

Tabla 5. Efecto nematicida de cultivos completos de *Bacillus thuringiensis* en *Meloidogyne incognita*.

CEPAS	MORTALIDAD % Cultivo completo
HD-1	83
GM-2	86
GM-3	10
GM-34	78
HD-37	62
HD-59	81
HD-63	15
GM-70	84
HD-73	67
GM-103	18
HD-116	72
HD-162	30
HD-183	71
HD-187	33
HD-241	70
HD-263	67
HD-266	45
HD-324	16
HD-530	65
HD-559	22
HD-567	12
HD-615	76
HD-652	60
Control 1	7
Control 2	5

Nematodos inmovilizados fueron contados como muertos

Mortalidad = # muertos / total x 100

Datos son promedios de 3 replicas

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL IN VITRO.

La actividad nematicida de las proteínas cristal purificado de *Bt* (14 cepas) con mortalidad superior al 60% en los bioensayos de cultivo completo se probó en J₂ de *M. incognita* con el fin de identificar las cepas más potentes. Los datos en la tabla 6 muestran el efecto de diferentes concentraciones de proteína cristal solubilizada de las cepas. Las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 demostraron la más alta actividad nematicida (66, 76, 68 y 70%) respectivamente a una concentración de 30 µg/ml después de 24 h de incubación.

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad de diferentes concentraciones proteínas cristal purificadas de *Bacillus thuringiensis* contra *Meloidogyne incognita*.

Cepas	Concentración de proteína (µg/ml)		
	30	15	7
HD-1	66	60	44
GM-2	76	72	51
GM-34	45	45	37
HD-37	50	46	42
HD-59	68	60	38
GM-70	70	66	40
HD-73	42	39	12
HD-116	52	46	23
HD-183	58	52	35
HD-241	41	40	19
HD-263	46	38	18
HD-530	44	40	21
HD-615	43	29	19
HD-652	32	27	20
Control		8	

Nematodos inmovilizados fueron contados como muertos

Mortalidad = # muertos / total x 100

Datos son promedios de 3 replicas

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE LAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES IN VITRO.

La actividad nematocida de los sobrenadantes de *Bt* (14 cepas) con mortalidad superior al 60% en los bioensayos de cultivo completo se probó en J₂ de *M. incognita* con el fin de identificar las cepas más potentes. Los datos en la tabla 7 muestran el efecto de los sobrenadantes en los nematodos. Las cepas HD-1, GM-2, GM-34, HD-59, GM-70 y HD-183 demostraron actividad nematocida de 30% o superior después de 24 h de incubación.

Tabla 7. Efecto nematocida del sobrenadante de cultivos de *Bacillus thuringiensis* en *Meloidogyne incognita*.

CEPAS	MORTALIDAD % Sobrenadante
HD-1	30
GM-2	31
GM-34	35
HD-37	5
HD-59	36
GM-70	30
HD-73	6
HD-116	16
HD-183	30
HD-241	4
HD-263	23
HD-530	27
HD-615	24
HD-652	6
Control 1	6
Control 2	0

Nematodos inmovilizados fueron contados como muertos

Mortalidad = # muertos / total x 100

Datos son promedios de 3 replicas

EVALUACIÓN DE LAS CEPAS QUE PRESENTARÓN MEJORES RESULTADOS IN VITRO A NIVEL INVERNADERO UTILIZANDO PLANTAS DE BELÉN (*Impatiens sultanii*) INFESTADAS CON *Meloidogyne incognita*.

La tabla 8 muestra la actividad nematocida de las 3 fases, cultivo completo, sobrenadante y complejo espora cristal de 4 cepas (con mejor actividad in vitro) bajo condiciones de invernadero. Todos los tratamientos mostraron un efecto de reducción en el número de nódulos y número de masas de huevecillos. El cultivo completo de GM-2 logró un 58% de reducción en el número de nódulos y un 70% en la reducción de número de masas de huevecillos. Por su parte los cultivos completos de HD-1, HD-59 y GM-70 mostraron porcentajes de reducción en el número de masas de huevecillos superior al 60% (63, 67 y 65% respectivamente).

Tabla 8. Efecto de las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 en plantas de belén infectadas artificialmente con *Meloidogyne incognita*

CEPA	# DE NODULOS	% REDUCCION	# DE MASAS DE HUEVECILLOS	% DE REDUCCION
CONTROL	420	-	354	-
HD-1				
Cultivo Completo	259	38	131	63
Sobrenadante	318	24	163	54
Espora-cristal	280	33	242	32
GM-2				
Cultivo Completo	177	58	107	70
Sobrenadante	332	21	170	52
Espora-cristal	223	47	130	63
HD-59				
Cultivo Completo	269	36	116	67
Sobrenadante	298	29	142	60
Espora-cristal	351	16	154	56
GM-70				
Cultivo Completo	220	48	125	65
Sobrenadante	297	29	245	31
Espora-cristal	256	39	197	44

$\% \text{ de Reducción} = \text{Control} - \text{Tratamiento} / \text{Control} \times 100$

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE SOBRENADANTES QUE PRESENTARÓN MAYOR ACTIVIDAD TOXICA CONTRA *Meloidogyne incognita*.

La capacidad hidrolítica de las cepas se reconoció mediante la formación de halos traslúcidos alrededor de las colonias (Figura 10). Las 4 cepas de *Bt* (HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70) con actividad nematocida formaron un halo de hidrólisis en el medio suplementado con leche descremada, comprobando la producción de proteasas, las cuales tienen posiblemente parte del efecto nematocida de los sobrenadantes de estas cepas.



Figura 10. Halo de hidrólisis de actividad proteolítica de *Bt* en Agar métodos estándar suplementado con 1% de leche descremada.

Las proteínas colectadas del sobrenadante de las 4 cepas con mejor actividad nematocida en los bioensayos de cultivo completo y sobrenadante fueron evaluadas en un gel de SDS-poliacrilamida y mostraron diferentes perfiles proteicos. En las 4 cepas analizadas se observó una banda con un peso molecular entre 41-43 KDa (Figura 11).

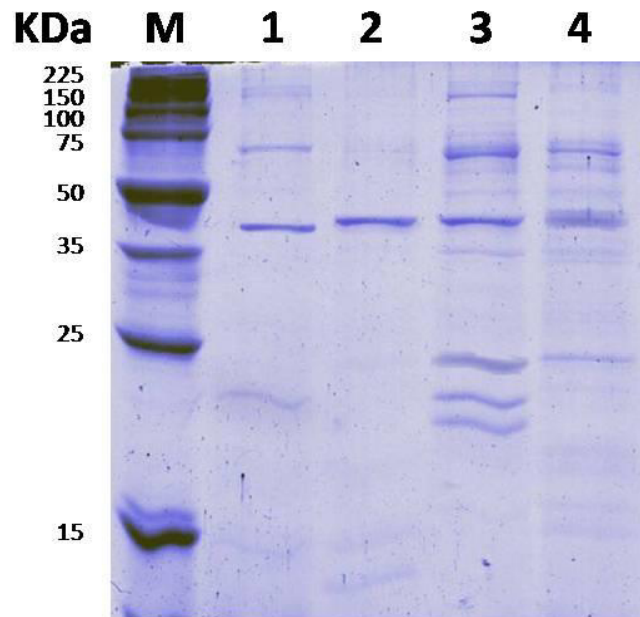


Figura 11. SDS-PAGE de proteínas del sobrenadante de las cepas seleccionadas de *Bt*. Carril M, Marcador de proteína preteñido, carril 1-4 representan las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 respectivamente. El gel de proteína fue teñido con azul de Coomassie.

La tabla 9 muestra que la actividad proteolítica se detectó en los cuatro sobrenadantes de las cepas usando el kit QuantiClave.

Tabla 9. Actividad proteolítica de 4 cepas de *Bacillus thuringiensis*

Cepa	A ₄₅₀
HD-1	1.15
GM-2	0.88
HD-59	1.33
GM-70	0.75

La actividad proteolítica se midió con Succinato de Caseína (QuantiClave Protease Assay Kit). Se incubó a 30°C por 30 min, seguido por 20 min con el reactivo colorimétrico.

Valores son promedios de 3 repeticiones

IDENTIFICACIÓN DE GENES *cry* PRESENTES EN LAS CEPAS CON MAYOR ACTIVIDAD TOXICA CONTRA *Meloidogyne incognita*.

Las 4 cepas que presentaron los porcentajes de mortalidad más altos con las proteínas cristal purificadas se caracterizaron por SDS-PAGE. Los resultados muestran que estas cepas sintetizan proteínas con pesos moleculares entre 28 y 140 kDa (Figura 12). Las cepas producen 2 a 5 proteínas con bandas en este rango.

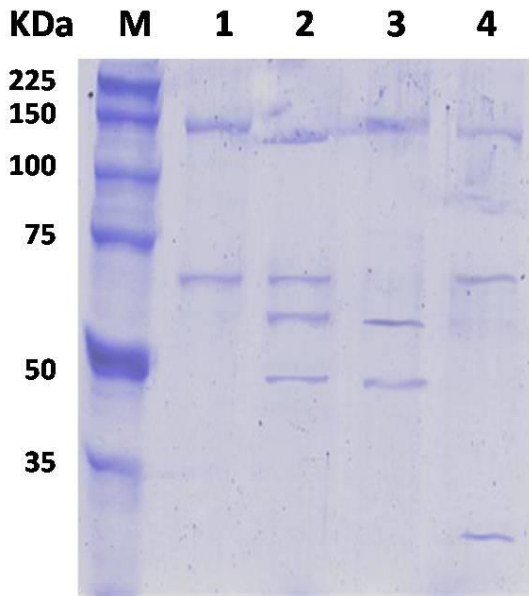


Figura 12. SDS-PAGE de proteínas cristal de las cepas seleccionadas de *Bt*. Carril M, Marcador de proteína preteñido, carril 1-4 representan las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 respectivamente. El gel de proteína fue teñido con azul de Coomassie.

En la metodología descrita previamente se utilizaron 12 iniciadores para detectar 6 diferentes genes Cry con actividad nematocida, *cry5*, *cry6*, *cry12*, *cry13*, *cry14* y *cry21* (Tabla 2). La Figura 13 muestra los productos de PCR obtenidos con las 4 cepas. Los resultados muestran que de las 4 cepas solo la GM-2 contenía 2 genes *cry* contra nematodos, resultando positiva para *cry12* y *cry14* mostrando los productos de PCR esperados.

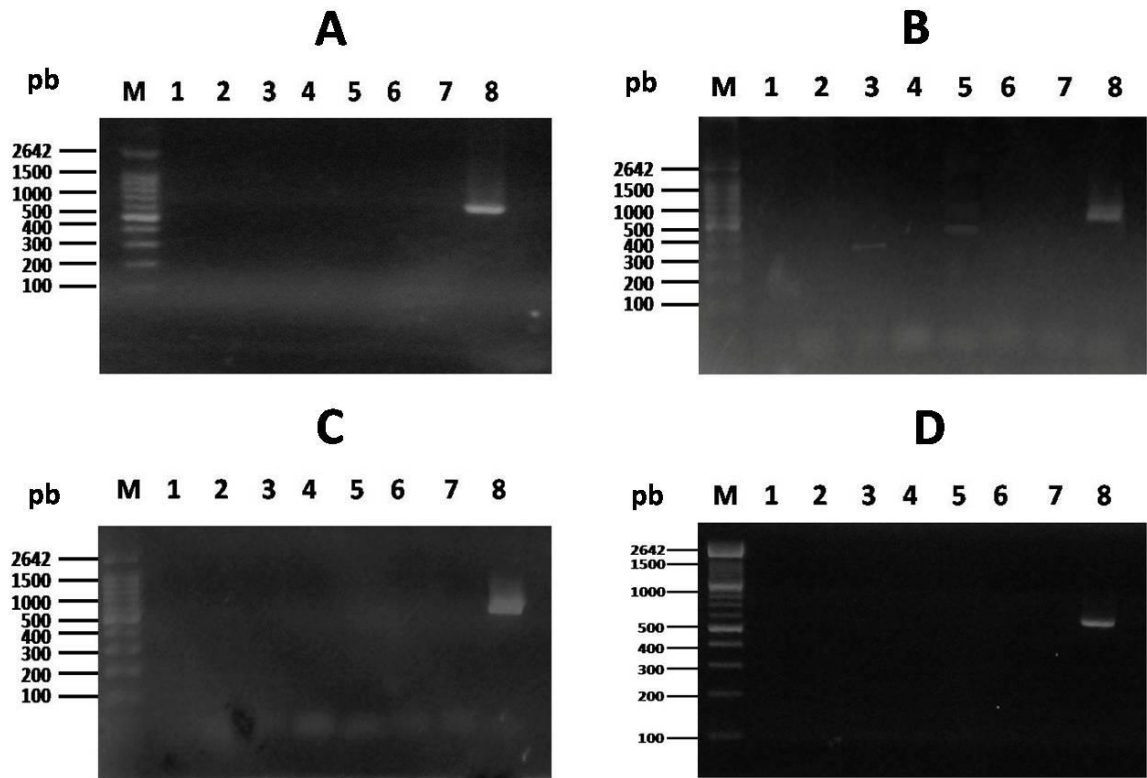


Figura 13. Productos de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de 4 cepas. (A) Electroforesis con ADN de cepa HD-1. (B) Electroforesis con ADN de cepa GM-2. (C) Electroforesis con ADN de cepa HD-59. (D) Electroforesis con ADN de cepa GM-70: Carril M, marcador de tamaño molecular; 1 *cry5*; 2 *cry6*; 3 *cry12*; 4 *cry13*; 5 *cry14*; 6 *cry21*; 7 control negativo; 8 control positivo.

DISCUSIÓN

Los cultivos de importancia económica siempre se han visto amenazados por el ataque de diferentes plagas, los nematodos fitoparásitos son responsables de pérdidas económicas considerables. *M. incognita* es probablemente el nematodo fitopatógeno más ampliamente distribuido y económicamente importante en regiones tropicales y subtropicales, ocasiona pérdidas importantes en los cultivos de algodón, tabaco, leguminosas, hortalizas, papa, especias y café. Los métodos para el control de *M. incognita* varían con el sistema de producción y el valor comercial del cultivo; el control químico es utilizado en cultivos de alto valor y se encuentra disponible una amplia variedad de plaguicidas. En este trabajo se buscó entre las cepas nativas de *B. thuringiensis* del Instituto de Biotecnología, aquellas con alta actividad nematicida contra *Meloidogyne incognita*, determinando el efecto nematicida del complejo espora cristal (endotoxinas) y productos extracelulares (exotoxinas) con el fin de obtener nuevas cepas nematicidas, que encaminen al desarrollo de un producto comercial y proponer la sustitución de plaguicidas químicos tóxicos.

Poblaciones *Meloidogyne incognita* fueron establecidas exitosamente en raíces de belén, tomate y pepino. Previos reportes documentan el mantenimiento de *Meloidogyne* spp. en raíces de tomate, tabaco, soya, papa y *Arabidopsis thaliana* (Orion *et al.* 1995; Wu *et al.*, 1998; Mitkowski and Abawi, 2002). La SAGARPA considera a *Meloidogyne incognita* como una plaga importante para el Estado de Nuevo León (SENASICA-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas 2014) y menciona más de 20 plantas en el Estado susceptibles entre ellas plantas ornamentales como el belén. Los resultados mostraron que las tres plantas usadas belén, tomate y pepino

fueron susceptibles y presentaron los nódulos característicos en raíces así como debilitamiento general, las plantas de belén resultaron ser las más afectadas y mejor opción para mantener los nematodos y realizar los ensayos en invernadero con promedios de # masas de huevecillos de 125 y # de huevecillos por masa de 87. Aunque este número es menor que en otros estudios como Mitkowski and Abawi (2002) que lograron cultivos con masas de 465 huevecillos en promedio en raíces de tomate y Orion *et al.*, (1995) obtuvieron 360 huevecillos en promedio por masa en raíces de papa. Los resultados generados en este estudio en combinación con el de estos investigadores demuestran un método fácil y seguro para mantener muchas poblaciones de nematodos por largos periodos de tiempo.

En México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) reportó la presencia del nematodo *M. incognita*, la cuales una plaga importante para el estado de Nuevo León (SENASICA-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas 2014). Típicamente, las especies de nematodos del género *Meloidogyne* son identificados por claves taxonómicas de acuerdo con las características morfológicas de las muestras observadas bajo el microscopio (Powers, 2004). Los criterios morfológicos representan un problema debido a la variabilidad y la necesidad de personal con experiencia para lograr una identificación fiable de la especie (Williamson *et al.*, 1997). La identificación de *Meloidogyne* spp. se basa en la morfología de las hembras adultas (Eisenback *et al.*, 1981). Sin embargo, un método rápido para la identificación de nematodos en la etapa J₂ podría mejorar las decisiones para el manejo óptimo de los cultivos infectados (Powers and Harris, 1993).

En este trabajo, se logró la identificación de una especie de nematodo fitoparásito de raíz usando la secuencia de regiones ITS de ADNr. Los 66 porcentajes de identidad por pares de las 12 secuencias nucleotídicas (secuencias T7 y SP6 de los 6 plásmidos secuenciados) oscilaron entre 99.6 y 100 %, lo cual permitió calcular una secuencia consenso. Además, la secuencia nucleotídica consenso presentó una identidad del 99.8% (2 diferencias, una generada por el oligonucleótido ITS1) con una región ADNr de *M. incognita* (Figura 9) que incluye la región 3' de 18S, el espaciador transcrito interno 1, la región 5.8S, el espaciador transcrito interno 2 y una parte de la región y 5' 28S. Por

tanto, el nematodo desconocido fue identificado como *Meloidogyne incognita*. El protocolo utilizado facilita la identificación o confirmación de las especies, evitando la dependencia de personal experimentado para la correcta identificación de los nematodos por el uso de claves taxonómicas.

Otros métodos de extracción de ADN usados para el ADN genómico a partir de los nematodos fitoparásitos, incluyen una ruptura del tejido celular por presión (Powers and Harris, 1993), el uso de soluciones de lisis con proteinasa K (Williamson *et al.*, 1997), y la extracción de ADN con fenol-cloroformo seguido de precipitación con etanol (Williamson *et al.*, 1997) o isopropanol (Blok *et al.*, 1997). En este trabajo se usó buffer TSNT como solución de lisis y el fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para la extracción de ADN. Este método permitió obtener ADN genómico de alta calidad suficiente para llevar a cabo la amplificación por PCR de las regiones ITS del ADNr.

La CDFA (Departamento de Alimentos y Agricultura de California, EE.UU.) incluye el uso de métodos moleculares en sus protocolos para la identificación de los géneros y especies de diferentes nematodos parásitos de las plantas, como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de productos amplificados (PCR-RFLP) (Dong, 2007). Actualmente en la base de datos GenBank se encuentran 5238 secuencias de regiones ITS de nematodos, de estas secuencias 139 corresponden a nematodos del género *Meloidogyne*. Por lo tanto, la secuenciación de regiones ITS de nematodos problemáticos y la búsqueda en bases de datos de nucleótidos es una alternativa adecuada para su identificación. Y la metodología desarrollada es una aportación para su uso en trabajos posteriores.

Los nematodos son susceptibles a infecciones por bacterias y hongos. Esto crea la posibilidad de usar microorganismos del suelo para el control de nematodos parásitos de plantas. Las bacterias afectan a los nematodos con una variedad de formas: por ejemplo parasitando; produciendo toxinas, antibióticos o enzimas; interfiriendo con el reconocimiento del nematodo con su planta hospedera; compitiendo por nutrientes; y promoviendo la salud de la planta. Los bioensayos con el cultivo completo se realizaron con 5 serovariedades: *kurstaki*, *israelensis*, *sotto*, *morrisoni* y *thuringiensis*. Los estudios de Jacq *et al.* (1977), Zuckerman *et al.* (1993), Leyns *et al.* (1994), Márquez and

Fernandez, (2006) y Mohammed *et al.*, (2008) muestran que estas 5 serovariedades tienen gran potencial en el control biológico de nematodos. En este estudio los bioensayos demostraron que 14 cepas (60.86%) de 23 cepas presentaban una mortalidad superior al 60%, se tomó como mínimo una mortalidad de 60% para ser considerada como una buena actividad nematicida.

Los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo concuerdan con Osman *et al.* (1988), Zuckerman *et al.* (1993), Carneiro *et al.* (1998) y El-Nagdi and Yossef (2004), quienes utilizaron cultivos completos de bacterias para probar su actividad contra J₂. De las cepas que mostraron actividad sobre *Meloidogyne incognita* predominan las variedades *kurstaki* y *morrisoni* solo una pertenece a la variedad *sotto* y una a *thuringiensis* lo que concuerda con el experimento realizado por Márquez and Fernández (2006) donde probaron el efecto de la mezcla de esporas y cristales y los sobrenadantes de 37 cepas de *Bt* contra *Meloidogyne incognita*, la cepa que mostró mejor actividad fue *kurstaki*, seguida por *morrisoni* e *israelensis*, esta última contrasta con el presente trabajo ya que *israelensis* no presentó buena actividad contra *Meloidogyne incognita*.

Los logros obtenidos hasta la fecha sugieren que las proteínas Cry también son un grupo importante de toxinas activas contra los nematodos y que el modo de acción de estas proteínas Cry parece ser similar a la forma que actúan las toxinas en contra de la Clase Insecta. El efecto nematicida de las proteínas cristal en J₂ de *M. incognita* muestra que las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 presentaron la más alta actividad nematicida (66, 76, 68 y 70%). Estos resultados concuerdan con trabajos previos en donde logran porcentajes de mortalidades similares o inferiores usando proteínas cristal (Leynset *et al.*, 1995; Shahnaz *et al.*, 2008; Tamer *et al.*, 2009). En contraste Mohammed *et al.* (2008) investigaron el potencial nematicida de las proteínas cristal de 10 aislados de *Bt in vitro* contra *Meloidogyne incognita* y reportaron la cepa *Bt7N* con porcentajes de mortalidad de hasta 100%. Las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 pertenecen a las variedades *kurstaki*, *morrisoni*, *thuringiensis* y *sotto* respectivamente. Muchos investigadores han utilizado una amplia variedad de técnicas para identificar y caracterizar cepas de *Bt* que llevan genes *cry* con actividad nematicida. Recientemente

muchos investigadores han recurrido al PCR para esta identificación (Ejiofor and Johnson 2002; Porcar and Juárez 2003; Gholamreza *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que de las 4 cepas con mejor actividad solo la cepa GM-2 resultó positiva para los genes *cry12* y *cry14*, lo cual puede estar relacionado con ser la cepa con mayor actividad nematicida en cultivo completo (86%) y en bioensayo con las proteínas cristal (76%). Las cepas HD-1, HD-59 y GM-70 que mostraron buena actividad no resultaron positivas para ningún de los 6 genes *cry* reportados para nematodos, pueden ser candidatas para albergar nuevos genes *cry* o tener actividad nematicida en otros genes *cry* conocidos. Las proteínas cristal analizadas por SDS-PAGE muestran proteínas con pesos moleculares entre 28 y 140 kDa, perfiles proteicos que concuerdan con los resultados de Mohammed *et al.* (2008) Gholamreza *et al.* (2008) y Tamer *et al.* (2009).

Las proteasas son constituyentes esenciales de todas las formas de vida en la tierra. Estas pueden ser producidas en grandes cantidades en tiempos relativamente cortos por métodos de fermentación. Los microorganismos representan una de las dos terceras partes de la producción de proteasa comercial en el mundo (Gupta *et al.*, 2002). Los estudios *in vitro* de la actividad nematicida de las proteínas sobrenadantes indican que la cepa HD-59 obtuvo la más alta actividad con 36% de mortalidad, este porcentaje contrasta con resultados como Carneiro *et al.* (1998) donde evaluaron 21 cepas de *Bacillus* spp. contra *Meloidogyne javanica* usando el sobrenadante, y la cepa *Bt brasiliensis* resulto efectiva contra los juveniles con 100% de mortalidad, Niu *et al.* (2005) usando el sobrenadante de la cepa *Bacillus* sp. B16 mató alrededor del 80% de los nematodos en el bioensayo, Lian *et al.* (2007) analizaron las proteínas sobrenadantes de 5 cepas de *Bacillus* spp. donde la cepa RH219 alcanzo un 80% de mortalidad. Los resultados del SDS-PAGE de los sobrenadantes muestran que las 4 cepas analizadas presentan una banda de entre 41-43 KDa, polipéptidos de este peso molecular son esperados para proteínas vegetativas con actividad tóxica para nematodos de acuerdo a los trabajos realizados por Niu *et al.* (2005), Lian *et al.* (2007) y Mohammed *et al.* (2008). El kit comercial QuantiCleave confirmó la actividad proteolítica de los sobrenadantes de estas cepas, Esto nos sugiere que la actividad nematicida de los sobrenadantes podría estar relacionada con alguna proteasa producida por *Bacillus thuringiensis*.

Los resultados del experimento en invernadero indican que el cultivo completo, el sobrenadante y espora-cristal de las 4 cepas seleccionadas mostraron un efecto de reducción en el número de nódulos y número de masas de huevecillos de *M. incognita*. Los datos indican que ambos, el cultivo completo y el complejo espora-cristal de la cepa GM-2 fueron los más activos en la reducción de número de nódulos y de masas de huevecillos. En todos los tratamientos los porcentajes más altos de reducción de número de nódulos y de masas de huevecillos se obtuvieron con el cultivo completo, lo cual puede indicar una sinergia entre las proteínas cristal y las proteínas sobrenadantes. Estudios previos han reportado que la cepa *Bt* CR-371 logra un 53% de reducción en el número de nódulos de *M. incognita* en plantas de tomate (Zuckermann *et al.*, 1993). Mohammed *et al.* (2008) obtuvieron 52% de reducción en nódulos de *Meloidogyne* con el sobrenadante de la cepa *Bt*7N. López *et al.* (2011) probaron la eficacia de 4 Nematicidas Biológicos donde el producto Avid® con el ingrediente activo abamectina alcanzo un 98% de reducción en nódulos causados por *Meloidogyne incognita* en condiciones de invernadero, en cambio productos comerciales como Nema-Q™ y DiTera® no lograron más de 40% de reducción.

En los últimos 20 años muchos estudios se han encargado de investigar el uso de microorganismos como agentes de biocontrol contra plagas de nematodos, sin embargo solo se han desarrollado pocos productos comerciales. Los formulados de *Bacillus thuringiensis* han demostrado ser amigables al medio ambiente, los resultados obtenidos in vitro así como en invernadero en el presente trabajo son prometedores para poder usar cepas como un potencial agente de biocontrol y ser una alternativa a los pesticidas químicos para evitar la contaminación y daño al ambiente. Sin embargo hace falta investigación para caracterizar las proteínas excretadas a los sobrenadantes, caracterización de potenciales nuevos genes *cry* contra nematodos así como evaluar las cepas in vivo, para incrementar la validez y uso potencial.

CONCLUSIONES

Se logró implementar un sistema para el mantenimiento y reproducción de *Meloidogyne incognita* en tomate, pepino y belén.

El método para mantener poblaciones de nematodos usando plantas susceptibles como el belén, pepino y tomate es económico y relativamente poco complicado

La habilidad para producir grandes cantidades de nematodos bajo condiciones asépticas tiene considerable uso en estudios moleculares y estudios de mortalidad.

La porción génica secuenciada en este trabajo presenta una similitud de 99% respecto a una secuencia génica perteneciente a *Meloidogyne incognita*.

Los métodos moleculares y bioinformáticos son una herramienta útil y rápida para el diagnóstico de fitoparásitos del género *Meloidogyne*. Este estudio aporta una opción rápida para la identificación de nematodos en etapas juveniles y además demuestra que la amplificación y análisis de regiones ITS tiene ventajas respecto a los métodos tradicionales.

La claridad de los resultados permite la identificación de más especies de nematodos, además es un método fácil, adecuado tanto para juveniles machos como hembras, no dependiente de criterios subjetivos y que no requiere del apoyo inmediato de especialistas en taxonomía de nematodos fitoparásitos.

Las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 mostraron mortalidad mayor al 80% en bioensayos in vitro con cultivos completos.

Las cepas GM-2 y GM-70 mostraron mortalidad mayor al 70% en bioensayos in vitro con la proteína cristal (34µg/ml). En los ensayos de PCR realizados solo la cepa GM-2 resulto positiva para los genes Cry12 y Cry14 con los primers utilizados.

El efecto nematocida de los sobrenadantes in vitro muestra que las cepas HD-1, GM-2, GM-34, HD-59 y GM-70 tuvieron un efecto nematocida mayor al 30%.El método de hidrólisis en Agar permitió demostrar que dichas cepas poseen enzimas con actividad proteolítica. El Kit comercial QuantiClave funcionó para detectar la actividad proteolítica en los sobrenadantes de las cepas.

Las cepas HD-1, GM-2, HD-59 y GM-70 con los tratamientos Cultivo completo, Sobrenadante y Complejo Espora-Cristal mostraron efecto de reducción en el número de nódulos en la raíz y número de masas de huevecillos en los experimentos de invernadero.

Este estudio aporta resultados para considerar a la cepa GM-2 como un posible agente de control biológico contra nematodos *Meloidogyne incognita*, sin embargo se requiere investigación adicional para identificar los principios activos en su toxicidad, esto ayudara a incrementar su potencial como agente de control biológico para nematodos.

REFERENCIAS

Adam MAM, Phillips MS, Blok VC. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*. 56:190–197.

Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press: New York, USA, pp. 734-749.

Aizawa K. 1974. Selection and utilization of *Bacillus thuringiensis* strains for microbial control, 1st. Interstitial Congress of the Association of microbiological societies. Tokio, Japan, March 1-10.

Aranson E, Beckman A, Dunn P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and the related insect pathogens. *Microbiology Rev* 50: 1-24.

Barberá C. 1976. *Pesticidas Agrícolas*. Segunda Edición. Ediciones Omega S.A.: Barcelona, España pp. 9 –30.

Bartelt RJ, McGuire MR and Black DA. 1990. Feeding stimulants for the european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) : Additives to a starch based formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol* 19: 182-189.

Blok VC, Phillips MS and Fargette M. 1997. Comparison of sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root-knot nematodes. *Journal of Nematology*. 29:16-22.

Boina D, Lewis E, Bloomquist J. 2008. Nematicidal activity of anion transport blockers against *Meloidogyne incognita*, *Caenorhabditis elegans* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Pest management science* 64: 646-653.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.

Bravo A, Hendrickx K, Jansens S and Peferoen M. 1992. Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 247-254

Caballero P, Iriarte J. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*, en Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. Editorial M. V. Phytoma-España: Valencia, España pp. 16-44.

Carneiro RM, Souza IS, Belarmino LC. 1998. Nematicidal activity of *Bacillus spp.* Strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 22 (1): 12-21.

Cenis JL. 1993. Identification of four Major *Meloidogyne spp.* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology.* 83: 76-80.

Cerón J. 2001. Productos comerciales: nativos y recombinantes. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Editorial Buena Semilla: Bogotá, Colombia, pp. 123-147.

Cisneros F. 1995. Control de plagas Agrícolas [internet] Disponible en: http://www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto1995/cpa_toc.htm. (Consulta, enero 2013)

Couch T. 1978. Formulations of Microbial Insecticides. Conventional Formulations. *Entomol. Soc. Am.* 10: 3-10.

Cox, GN, Kusch M and Edgar RS. 1981. Cuticle of *Caenorhabditiselegans*: its isolation and partial characterization. *J Cell Biol.* 90: 7-17.

De Luna Santillana E. 2002. Desarrollo de Formulaciones de *Bacillus thuringiensis* a partir de Gelatina y/o Pectina y evaluacion toxica contra el Barrenador del tallo de la caña de Azúcar "*Diatraea saccharalis fabricius*" Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.

Di Vito M, Vovlas N and Castillo P. 2004. Host-parasite relationships of *Meloidogyne incognita* on spinach. *Plant Pathology* 53: 508-514.

Dong K. 2007. PCR-RFLP Identification of *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Heterodera spp.* and *Meloidogyne spp.* Disponible en: http://www.cdffa.ca.gov/plant/PPD/nematode_molecular.html. (Consulta, Abril 2014).

Dulmage HT, Correa JA and Martínez AJ. 1970. Coprecipitation with lactose as a Means of recovering the Spore-Cristal Complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 15-20.

Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN and Triantaphyllou AC. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), with a pictorial key. *Journal of Nematology*. 13: 513-521.

Ejiofor AO and Johnson T. 2002. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 284–290.

El-Nagdi WM and Youssef MM. 2004. Soaking faba bean seed in some bio-agents as prophylactic treatment for controlling *Meloidogyne incognita* root-knot nematode infection. *J. Pest Sci.* 77(2): 75-78.

Feitelson JS, Payne J. and Kim L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Nat Biotechnol.* 10: 271–275.

Ferrandis MD, Juarez-Pérez VM, Frutos R, Bel Y and Ferre J. 1999. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. *Syst. Appl. Microbiol* 22: 179–185.

Galán Wong LJ. 1993. Selección de cepas nativas y de extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens*. Tesis de Doctorado en Ciencias especialidad en Microbiología. Fac. de Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.

Galán-Wong LJ, García M, Quintero I. 1996. Producción de *Bacillus thuringiensis*, Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Primera edición Galán L. y Rodríguez C. (editores): Monterrey, pp. 139-155.

Gholamreza SJ, Seifinejad A, Saeezadeh A, Nazarian A, Yousefloo M, Soheilvand S, Mousivand M, Jahangiri R, Yazdani M and Sepideh A. 2008. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. *Microbiol.* 54: 812-822.

Giffer MC, Beumer RR, Klijn N, Wagwondorp A, Rombouts FM. 1997. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 146:47-51.

Gupta R, Beg OK, Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *ApplMicrobiolBiotechnol.* 59: 15-32.

Hall TA. 1999. BioEdit: A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.

Huang XW, Tian BY, Niu QH, Yang JK, Zhang LM and Zhang KQ. 2005. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res Microbiol* 156: 719–727.

- Jaramillo Pineda J. 2007. Evaluación de cinco productos naturales y un producto comercial Coax[®] como fagoestimulantes para el gusano de la bolsa de *Hyphantria cunea* Drury (Lepidóptera: Arctiidae) Tesis para el título de QBP. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.
- Kaelin P. 1993. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from tobacco and *Lsioderma serricornis* (F). Appl. Environ. Microbiol. 60: 19-25.
- Karamanlidou G. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). Appl. Environ. Microbiol. 57: 2277-2282.
- King E. 1996. Control biológico de insectos y ácaros plaga, Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Primera edición Galán L. y Rodríguez C. (editores): Monterrey, pp. 12-18.
- Lambert B and Peteroen M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*, Facts and mysteries about a successful biopesticide. Bioscience 42: 112-122.
- Leyns F, Borgonie G, Arnaut G and De Waele D. 1995. Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. Fundam. appl. Nematol. 18(3): 211-218.
- Lian LH, Tian BY, Xiong R, Zhu MZ, Xu J and Zhang KQ. 2007. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. Letters in applied Microbiology 45: 262-269.
- Lorence AR, Quintero I, 1996, Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Primera edición Galán L. y Rodríguez C. (editores): Monterrey, pp. 63-83.
- López-Pérez J A, Edwards S and Ploeg A. 2011. Control of Root-knot Nematodes on Tomato in Stone Wool Substrate with Biological Nematicides. Journal of Nematology 43(2): 110–117.
- Márquez ME, and Fernández E. 2006. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida. Manejo integrado de plagas y Agroecología 78: 63-69.
- McGuire MR, Shasha BS, Lewis LC, Bartelt RJ and Kinney K. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ Entomol. 83: 2207-2210.
- Mitkowski NA and Abawi GS. 2002, Monoxenic maintenance and reproduction of root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*) on multiple-species in vitro root culture systems. Plant Cell Rep 21:14–23.
- Mohammed SH, Anwer M, Mohamed RE, Ibrahim NE, Ghareeb A and Moustafa SA. 2008. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Journal of Cell and Molecular Biology 7(1): 57-66.

Mona BR and Moustafa AZ. 2004. Evaluation of Feeding Stimulant Mixed with Chemical and Bio Insecticides on Certain Lepidopterous Pests and their Natural Enemies in Cotton and Soybean Fields. *J. Appl. Sci. Environ Mgt.* 8(2): 77-83.

Morales Ramos L. 1996^a. Desarrollo de formulados granulares para incrementar la estabilidad ambiental de *Bacillus thuringiensis* usando diversos polímeros y su evaluación biológica. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.

Morales Ramos L. 1996^b. Formulados Bioinsecticidas, Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Primera edición Galán L. y Rodríguez C. (editores): Monterrey, pp. 157-175.

Niu QH, Huang W, Tian BY, Yang JK, Liu J, Zhang L, Zhang KQ. 2005. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69: 722–730.

Ntalli NG, Menkissoglu-Spiroudi U and Giannakou I. 2009. Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology* 156: 309-317.

Orion D, Wergin WP, Chitwood DJ. 1995. Root cortical cell spherical bodies associated with an induced resistance reaction in monoxenic cultures of *Meloidogyne incognita*. *J Nematol.* 27:320–327.

Orui Y. 1998. Identification of Japanese species of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae) by PCR-RFLP analysis. *Journal of Applied Entomology.* 33: 43-51.

Osman GY, Salem FM and Ghattas A. 1988. Bio-efficiency of two bacterial insecticide strains of *Bacillus thuringiensis* as a biological control agent in comparison with a nematocide, Phenamiphos, on certain parasitic nematodes. *J. Fac. Sci. Menoufia Univ.* 2: 17-25.

Porcar M and Juárez-Pérez VM. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 419–432.

Powers TO. 2004. Nematode molecular diagnostics: From Bands to Barcodes. *The Annual Review of Phytopathology.* 42:367–383.

Powers TO, Harris TS. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology.* 25:1-6.

Prasad SS, Tilak KV and Gollakota RG. 1972. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne*. spp. the causative agent of root-knot disease. *J. Invertebr. Pathol.* 20:377-378.

Quintero Ramírez R. 1997. Análisis Técnico-Económico Sobre la Producción de *Bacillus thuringiensis*. CamBioTec. 2: 27 -82.

Rodriguez C, Román E, Tamez R. 1996. Clasificación de *Bacillus thuringiensis*, Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Primera edición Galán L. y Rodríguez C. (editores): Monterrey pp. 51-61.

Rosas Garcia N. 2002. Elaboracion de formulados de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y determinación de la actividad toxica contra larvas de *Diatrea saccharalis* (Fabricius) Lepidoptera: (Pyralidae) en laboratorio y campo. Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.

Rosas García N, Arévalo K, Galán L, Morales L. 2004. Evaluation of feeding stimulants combined with polymers to develop formulations against *Diatraea saccharalis*. Southwestern entomologist 29 (2): 153-158.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 2100p.

Sasser J and Taylor A. 1983. Biología identificación y control de los nemátodos de nódulo de la raíz. Editorial Artes Gráficas de la Universidad del Estado de Carolina del Norte: Carolina del Norte, Estados Unidos, pp. 21-111.

Satoshi T, Sawada J and Moromizato Z. 2008. Nematicidal activity of Okinawa Island plantson the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. Plant Soil 303:207–216.

Schnepf HE, Crickmore N, Van Rie J, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR and Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.

SENASICA-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas. 2012. Ficha técnica de *Meloidogyne incognita*. Available at: <http://www.encuentra.gob.mx/resultsAPF.html?q=Meloidogyne%20incognita&client=sagarpa&ts=all&geo=0>. (Consulta, Marzo 2014).

Seo BJ, Rejish VJ, Ahmad RI, Kim B, Park W, Park S, Kim S, Sang, Lim J, Park YH. 2011. Bacterial Mixture from Greenhouse Soil as a Biocontrol Agent Against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita*, on Oriental Melon. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(1): 114–117.

Shahnaz D, Marium T, Zaki MJ. 2008. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood on cowpea and mash bean. *Pak. J. Bot.* 40(1): 439-444.

Shieh TR. 1988. Biological Insecticide and Biotechnology. American Chemical Society 17: 207-216.

Siddiqui, IA, Haas D and Heeb S. 2005. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Appl Environ Microbiol. 71: 5646–5649.

Siegel JP. 2001. The Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. Journal of Invertebrate pathology 77: 13-21.

Stock SP, Campbell JF and Nadler SA. 2001. Phylogeny of *Steinernematravassos*, 1927 (Cephalobina: *Steinernema*) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. Journal of Parasitology. 87:877-889.

Suxia G, Liu M, Peng D, Ji S, Wang P, Yu Z, Sun M. 2008. New Strategy for Isolating Novel Nematicidal Crystal Protein Genes from *Bacillus thuringiensis* Strain YBT-1518. Applied and Environmental Microbiology. 74(22): 6997–7001.

Tamer S, El-Moneim A and Samia I. 2009. The effect of endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* (bt.) against *Meloidogyne incognita*. Egyptian Journal of Natural Toxins. 6(1): 83-93.

Tamez-Guerra P, Iracheta M, Pereyra B. 2004. Characterization of mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for lepidopteran and colepteran larvae. J. Invertebrate Pathology 86: 7-18.

Torres A, Reyes Y, de la Torre M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de las plagas, Avance y Perspectiva 21: 291-295.

Vovlas N, Mifsud D, Landa BB and Castillo P. 2005. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. Plant Pathology. 54:657-664.

Wei JZ, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang SC and Aroian RV. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. Proc Natl Acad Sci 100: 2760–2765.

Williamson VM, Caswell-Chen EP, and Westerdahl FF. 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Journal of Nematology. 29:9-15.

Wishart J, Phillips MS and Blok VC. 2002. Ribosomal Intergenic Spacer: A Polymerase Chain Reaction Diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. Phytopathology. 92: 884-892.

Wu Y, Jenkins T, Blunden G, Von Mende N, Hankins SD. 1998. Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with alkaline extracts of *Ascophyllum nodosum*. J Appl Phycol. 10:91–94.

Zijlstra C, Lever AEM, Uenk BJ and Silfhout CH. 1995. Differences between ITS Regions of Isolates of Root-knot Nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology*. 85: 1231-1237.

Ziquan Y, Peisheng B, Weixing Y, Fengjuan Z, Lifang R, Ziniu Y and Ming S. 2008. A Novel Negative Regulatory Factor for Nematicidal Cry Protein Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(6): 1033–1039.

Zuckerman BM, Mai WF and Krusberg LR. 1990. Eds. *Plant Nematology Laboratory Manual – Revised Edition 1990*. University of Massachusetts Agricultural Experiment Station: Massachusetts, USA pp. 10-252.

Zukerman BM, Dicklow MB and Costa N. 1993. A strain of *Bacillus thuringiensis* for the control of plant parasitic nematodes. *Biocontrol of Science and Technology* 3(1): 41-46.

RESUMEN CURRICULAR

Juan Jaramillo Pineda

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Tesis:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE CEPAS NATIVAS Y DE COLECCIÓN DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA EL NEMATODO FORMADOR DE NÓDULOS DE LA RAÍZ (*Meloidogyne incognita*)

Campo de estudio: Control biológico

Datos personales: Nacido en Guadalupe Nuevo León, el 1 de Marzo de 1984, Hijo de Juan Jaramillo Jinez y Julia Pineda Pineda.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2005.

Experiencia profesional: Encargado del laboratorio de control analítico en la planta tratadora de aguas negras de APM 2006–Enero 2008, Profesor en la Universidad José Vasconcelos 2011-Enero 2013, Profesionista de apoyo del ITESM 2013-Julio 2014, Profesor de Microbiología y Bioquímica en la Facultad de Enfermería de la UANL 2011-Actual.