



Universidad del Mar
Campus Puerto Escondido

**Análisis de las secuencias y caracterización de los genes
de la flagelina en tres serovariedades de *Bacillus
thuringiensis***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Lic. en Biología

PRESENTA

Addy Guzmán Chavéz

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jorge E. Ibarra Rendón

Puerto Escondido Mixtepec, Oaxaca, Septiembre de 2011

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioinsecticidas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, del centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato bajo la dirección del Dr. Jorge E. Ibarra Rendón

AGRADECIMIENTOS

A la secretaria de Educación Pública (SEP) y al Sistema Nacional de Investigadores (SIN) por haberme otorgado la beca para la realización de la tesis.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) I.P.N. Unidad Irapuato, por haberme dado todas las facilidades para llevar a cabo mi trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Ibarra Rendón, por haberme aceptado en su Laboratorio, por el tiempo, la paciencia y la dedicación en la realización del trabajo de tesis.

A la M. en C. Elia Regina Basurto Ríos, por su colaboración y conocimientos aportados durante el desarrollo del presente trabajo y su amistad.

A la futura Dra. Mónica Galicia Jiménez por su disposición de estar en el comité evaluador por sus críticas y correcciones al escrito final, además de su gran apoyo moral.

Al Dr. Arturo de Nova Vásquez por el apoyo, la dedicación y los conocimientos aportados en los análisis genéticos de este proyecto.

A la M en C. Rosario García Alavés por el apoyo mostrado desde un principio y todas las aportaciones

A todos mis profesores de la licenciatura por inculcarme el amor y los conocimientos de la Biología así como sus consejos.

A mis compañeros de generación: Lucía, Carlos, Dora, Francisco Javier, Valeria, Oscar, Saira, Filo, Adolfo, Esmeralda y Epifanio. Por compartir la experiencia de la carrera universitarias y por todos los buenos momentos.

A mis compañeros del laboratorio de Bioinsecticidas y del CINVESTAV: Margarita, Dulce, Javier, Katty, Lizz Juan, Jacobo, Cris, Vero, Oscar, Kaneck, Vivi, alex, Gerardo, Conchita,

DEDICATORIA

A mi madre, Luisa Chavéz Solano,
por su amor infinito, enseñanzas, apoyo
que siempre me brinda y mi modelo a seguir

A mi padre, Roberto Guzmán Cruz,
Por mostrarme que la vida no se
debe tomar tan seria y por su amor

A mi hermanita Lubianka Guzmán Chavéz
Que es una bendición en mi vida y un motor
Muy importante para ella.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
RESUMEN	III
ABSTRAC	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
2.2 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
2.3 Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.4 Modo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
2.5 Genética de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2.5.1 Plásmidos	12
2.6 Toxinas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.7 La flagelina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.8 Clasificación y relaciones de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
2.9 Caracterización de las variedades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
2.9.1 Caracterización morfológica	20
2.9.2 Caracterización bioquímica	20
2.9.3 Caracterización toxicológica y patotipos	21

2.9.4	Caracterización serológica (serotipificación)	22
2.10	Herramientas moleculares en la clasificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
2.10.1	Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	28
2.10.2	Amplificación polimórfica al azar (RAPD)	29
2.10.3	Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	29
2.10.4	REP-PCR y ERIC-PCR	30
2.10.5	Electroforesis en campos pulsados (PFGE)	30
2.10.6	Secuenciación DNA	31
3.	JUSTIFICACIÓN	32
4.	OBJETIVOS	33
4.1	Objetivo general	33
4.2	Objetivos específicos	33
5.	HIPÓTESIS	33
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	34
6.1	Cepas de estudio	34
6.2	Extracción de DNA	34
6.3	Amplificación de los genes de la flagelina	35
6.4	Electroforesis de los productos de PCR	38
6.5	Preparación de las muestras para secuenciar	38
6.6	Cuantificación de DNA	39

6.7	Secuenciación	40
6.8	Formato de envío de resultados	41
6.9	Análisis de secuencias, alineamiento y reconstrucción del árbol de relaciones	41
7.	RESULTADOS	43
7.1	Extracción de DNA genómicos	43
7.1.1	Extracción de DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>israelensis</i>	44
7.1.2	Extracción de DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>kurstaki</i>	45
7.1.3	Extracción de DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>morrisoni</i>	46
7.2	Amplificación de los genes de la flagelina	47
7.2.1	Amplificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>israelensis</i>	47
7.2.2	Amplificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>morrisoni</i>	49
7.2.3	Amplificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>kurstaki</i>	50
7.3	Análisis de las secuencias	51
7.4	Árbol de relaciones	56
8.	DISCUSIÓN	61
9.	CONCLUSIONES	67
10.	BIBLIOGRAFÍA	68
11.	APÉNDICE	78

ÍNDICE DE FIGURA

	Página
Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión de la esporulación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
Figura 2. Inclusiones del cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
Figura 3. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
Figura 4. Mecanismo de la toxina proteica Cry	11
Figura 5. Estructura del flagelo procariótico	17
Figura 6. Organización de los genes de la flagelina y genes vecinos	18
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el resultado de la extracción de DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>israelensis</i>	44
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el resultado de la extracción de DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>kurstaki</i>	45
Figura. 9. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el resultado de la extracción del DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovariedad <i>morrisoni</i>	46
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa, que muestra los productos de la amplificación por PCR de las cepas pertenecientes a la serovariedad <i>israelensis</i>	48
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa, que muestra los productos de la amplificación por PCR, de la serovariedad <i>morrisoni</i>	50
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa, que muestra los productos de la amplificación por PCR, de la serovariedad <i>kurstaki</i>	53
Figura 13. Distribución de la secuencia de la cepa LBIT 899 consultada en el BLAST (Gene Bank)	58
Figura 14. Dendograma construido a partir de las secuencias de nucleótidos de las 30 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	55

Figura 15. Dendograma construido a partir de las secuencias de nucleótidos de 30 cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizando como grupo externo a *Bacillus subtilis* . Indicando los valores de remuestreo (Bootstrap) con 1,000 réplicas 59

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Lista de serovariedades tipo de <i>Bacillus thuringiensis</i> registrados en el Centro Internacional de <i>Bacillus</i> Entomopatógenos del Instituto Pasteur (París, Francia).	23
Tabla 2. Genes que mostraron alineamientos significativos con la secuencia de nucleótidos de la cepa LBIT 899, en el GeneBank.	53
Tabla 3. Análisis de la proporción de nucleótidos de los fragmentos secuenciados para cada cepa, obtenidos a partir del programa DAMBE 5.2.38	55
Tabla 4. Subgrupos que se forman a partir del dendograma con base en las secuencias de nucleótidos obtenidas y genes a los que corresponden de acuerdo al análisis de BLAST.	60

RESUMEN

En *Bacillus thuringiensis* la técnica empleada para la clasificación de las serovariedades ó subespecies ha sido la H-serotipificación. Ésta se basa en reacciones inmunológicas de los antígenos que se encuentran en el flagelo de la bacteria, la flagelina es la proteína implicada en la reacción. Hasta ahora se conoce que existen varios genes de flagelina descritos en *B. thuringiensis* entre los principales se encuentra *Hag*, *Fla A*, *Fla B* y *Fla C*. La secuencia específica de los aminoácidos han sido correlacionado con serovariedades H específicas, sin embargo no se han analizado las relaciones entre cepas pertenecientes a la misma serovariedad. En este estudio se analizaron los genes de la flagelina de 29 cepas pertenecientes las tres principales serovariedades de *B. thuringiensis* las cuales son: *israelensis*, *kurstaki* y *morrisoni*. Los genes de la flagelina fueron amplificados y secuenciados. En las cepas de las serovariedades *morrisoni* e *israelensis* se encontraron regiones pertenecientes al gen *Hag* mientras que en *kurstaki* se encontraron *Fla B* en su mayoría a excepción del *Fla A* detectado en la cepa LBIT-757. Estas secuencias fueron alineadas y sometidas a un análisis de distancias con el algoritmo de Neighbor Joining, con un análisis de remuestreo de 1,000 pseudoreplicas. De manera general en los dendogramas recuperan tres grupos bien definidos y soportados coincidiendo con las tres serovariedades. Por lo tanto las secuencias obtenidas a partir del dominio de los genes de la flagelina resultan de mucha utilidad para la discriminación y clasificación en cepas de *B. thuringiensis*.

ABSTRAC

In *Bacillus thuringiensis*, the classifications are based on immunological reaction in H serotyping, the genes encode flagellin, the protein responsible for eliciting reaction. The principal genes encoding flagellin are *Hag*, *Fla A*, *Fla B*, and *Fla C* and the amino acid sequences have been related with a specific serovar. Here, the presence of the flagellin genes was studied in 29 strains belonging to three principal serovars: *israelensis*, *kurstaki* and *morrisoni*. The flagellin genes were amplified and sequenced. We found in strains *morrisoni* and *israelensis* the gene *Hag* while in *kurstaki* we found majority *Fla B* perhaps in strain LBIT-757 we found *Fla A*. A bootstrapped neighbor-joining tree was generated from the alignment of nucleotide sequences. In addition, all serovars from the same H serotype were found clustered together. These suggest that the sequences obtained from the flagellin domain help for discrimination and classification in strains of *Bacillus thuringiensis*.